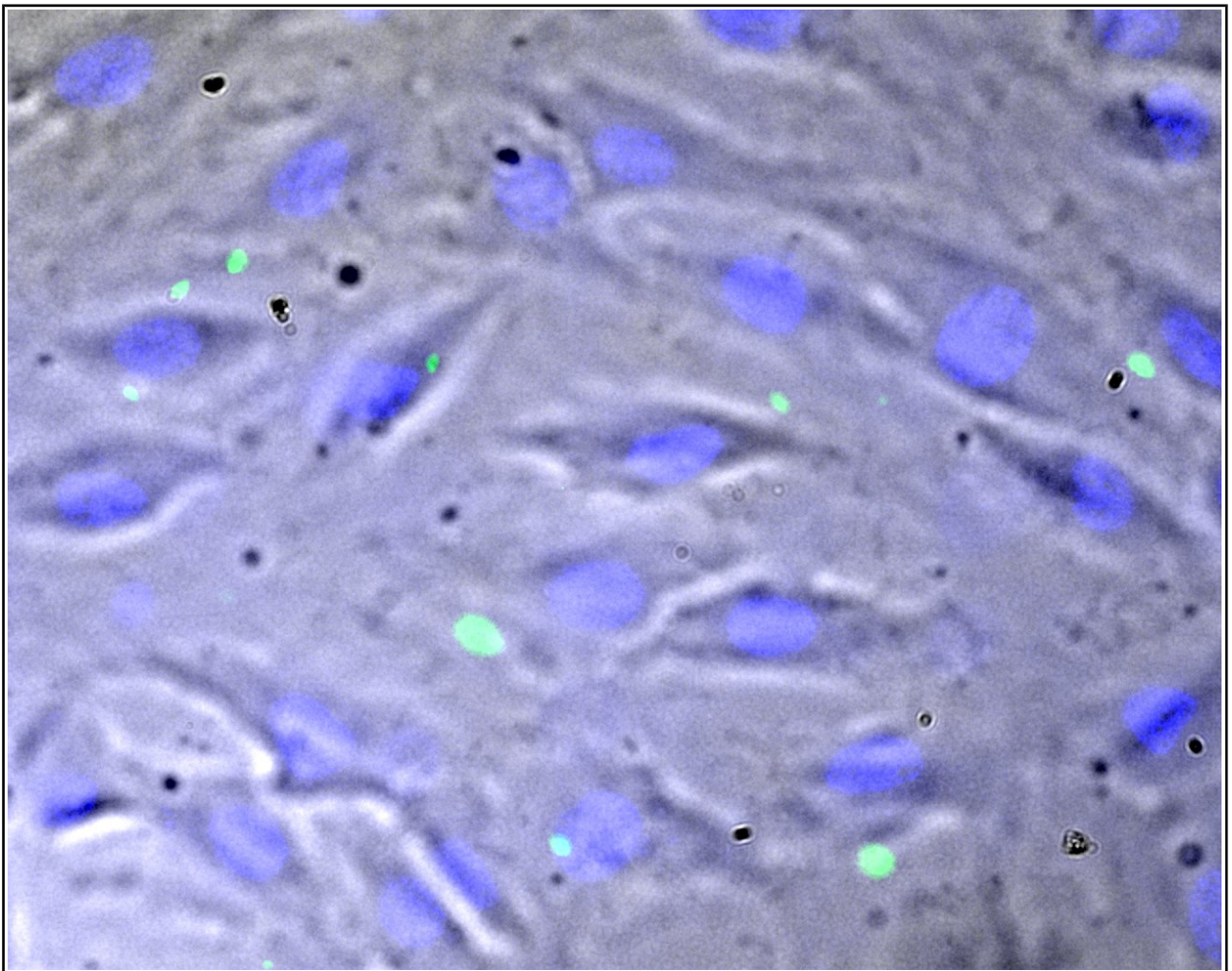




Departamento de Genética

Universidad de Sevilla

Estudio de la translocación al hospedador de los efectores PipB2 y SseK1 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y análisis genético de *sseK1*



Fernando Baisón Olmo

Tesis Doctoral

2016

Departamento de Genética

Universidad de Sevilla



Estudio de la translocación al hospedador de los efectores PipB2 y SseK1 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y análisis genético de *sseK1*

Trabajo presentado para optar
al Grado de Doctor en Biología por el licenciado

Fernando Baisón Olmo

Sevilla, Julio 2016

Director:

Dr. Francisco Ramos Morales

Catedrático de Genética

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
El género <i>Salmonella</i>	23
Procesos de infección por <i>S. enterica</i>	24
Modelo de ratón para el estudio de la virulencia de <i>Salmonella</i>	27
Modelo de líneas celulares para el estudio de la virulencia de <i>Salmonella</i>	28
Factores de virulencia.....	29
<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island 1 (SPI1).....	30
<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island 2 (SPI2).....	30
Otras islas de patogenicidad.....	31
Plásmido de virulencia.....	32
Adhesinas.....	33
Sistemas de secreción.....	33
T1SS.....	34
T2SS.....	35
T3SS.....	35
T4SS.....	36
T5SS.....	37
T6SS.....	37
Sistemas CU.....	38
Los T3SS de <i>Salmonella</i>	38
T3SS1.....	39
T3SS2.....	39
Regulación de los T3SS.....	40
Regulación del T3SS1.....	41
Regulación del T3SS2.....	43
Efectores de los T3SS de <i>Salmonella</i> y procesos en los que intervienen.....	45
Endocitosis mediada por <i>Salmonella</i>	47
Alteración de las uniones estrechas.....	50
Respuestas nucleares.....	50

Biogénesis de la SCV y proliferación intracelular de <i>Salmonella</i>	52
Muerte celular.....	57
Análisis de la translocación de los efectores de los T3SS.....	61
Secuencias para la secreción y translocación de efectores.....	62
PipB2.....	63
SseK1.....	64
OBJETIVOS	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
MATERIAL BIOLÓGICO	71
Estirpes bacterianas.....	71
Estirpes de levaduras.....	73
Bacteriófagos.....	73
Líneas de células de mamíferos.....	73
Ratones.....	74
CONDICIONES, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	74
Bacterias.....	74
Levaduras.....	76
Líneas celulares.....	77
MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN	77
Plásmidos.....	77
Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	79
Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN.....	80
Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	80
Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	81
Transformación.....	81
Transducción bacteriana.....	84
Construcción de estirpes bacterianas.....	87
Cebadores.....	87
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	90
Semi-random, Two-step PCR (ST-PCR).....	91
Mutagénesis dirigida.....	92
Inactivación de genes cromosómicos usando productos de PCR.....	93
Construcción de fusiones <i>lac</i>	95
Construcción de fusiones 3xFLAG.....	97
Construcción de fusiones CyaA'.....	98

Secuenciación.....	100
Análisis y comparación de secuencias.....	100
MANIPULACIÓN DEL ARN.....	100
Extracción de ARN con TRIzol®.....	100
Fenolización del ARN.....	101
qRT-PCR.....	102
Análisis de la expresión génica por <i>microarray</i>	103
ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	104
Preparación de extractos proteicos.....	104
Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	104
Tinción de geles con azul de Coomassie.....	105
Inmunodetección de proteínas mediante western blot.....	105
Fosforilación de la His ₆ -PhoP.....	107
Estudio de la interacción ADN-proteína mediante ensayo de cambio en la movilidad electroforética.....	107
ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	108
Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	108
Ensayos de actividad luciferasa.....	109
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	109
Ensayos de infección simple.....	109
Ensayos de infección mixta.....	110
Análisis de la translocación de efectores a la célula eucariota.....	112
ENSAYOS DE INFECCIÓN EN RATONES.....	112
Infección oral.....	112
Infección intraperitoneal.....	113
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	113
RESULTADOS.....	115
Capítulo 1: Generación de fusiones CyaA' para el estudio de la translocación de efectores de los T3SS de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium.....	117
Análisis de fusiones CyaA' aleatorias.....	119
PipB2 se transloca a la célula hospedadora a través del T3SS1.....	120
Cinética de translocación de PipB2 en células hospedadoras dependiente de T3SS1 y T3SS2.....	121
Síntesis de PipB2 bajo condiciones de inducción de SPI1 y SPI2.....	123
Análisis de la secuencia señal necesaria para la translocación de PipB2 a través del T3SS1.....	124
Generación de fusiones CyaA' dirigidas en el cromosoma de <i>S. enterica</i>	126

Capítulo 2: Análisis de la regulación de la expresión y de la translocación a células hospedadoras del efector SseK1	131
Contribución de SseK1 a la virulencia en ratones	133
Síntesis y translocación en células de mamíferos de SseK1 en condiciones de inducción de la SPI1 y la SPI2	134
Regulación de <i>sseK1</i> por el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP de manera independiente de SsrB	139
Regulación directa de la expresión de <i>sseK1</i> por PhoP	141
Expresión de <i>sseK1</i> dentro de macrófagos	144
Capítulo 3: Estudio preliminar del efecto de SseK1 en la célula hospedadora	147
Escrutinio genético para la identificación de proteínas humanas dianas de SseK1	149
Estudio a nivel transcripcional del efecto de SseK1 en células humanas HeLa	155
Análisis de ontología génica y de interacciones para los genes identificados en el estudio transcriptómico	158
Validación de los datos de las micromatrices mediante qRT-PCR	165
Cinética de expresión de los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 dependiente de SseK1 durante la infección con <i>Salmonella</i>	166
DISCUSIÓN	169
CONCLUSIONES	185
BIBLIOGRAFÍA	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Esquema de la clasificación del género <i>Salmonella</i>	24
Figura I.2: Patogénesis de la infección por <i>S. enterica</i>	25
Figura I.3: Modelo animal para el estudio de la patogénesis de <i>Salmonella</i>	28
Figura I.4: Ilustración esquemática de los genes de la SPI1.....	30
Figura I.5: Ilustración esquemática de los genes de SPI2.....	31
Figura I.6: Esquema de los principales sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.....	34
Figura I.7: Estructura y composición de los T3SSs de <i>Salmonella</i>	40
Figura I.8: Regulación de los T3SSs de <i>Salmonella</i>	42
Figura I.9: Representación esquemática de los T3SS1 y T3SS2 de <i>Salmonella</i>	46
Figura I.10: Cambios inducidos por el T3SS1 en las células hospedadoras.....	49
Figura I.11: Respuestas nucleares inducidas por efectores de <i>Salmonella</i>	52
Figura I.12: Biogénesis de la vacuola que contiene <i>Salmonella</i>	56
Figura I.13: Muerte de la célula huésped inducida por <i>Salmonella</i>	58
Figura M.1: Esquema explicativo del método ST-PCR.....	92
Figura M.2: Protocolo para eliminar regiones cromosómicas.....	94
Figura M.3: Esquema de la construcción de fusiones <i>lac</i> en el cromosoma.....	96
Figura M.4: Construcción de proteínas de fusión con el epítipo 3xFLAG.....	98
Figura R1.1: Translocación de PipB2 dependiente del T3SS1 en células HeLa, RAW264.7 y NRK.	121
Figura R1.2: Cinética de translocación de PipB2 al interior de células hospedadoras.....	123
Figura R1.3: Expresión de PipB2 en diferentes medios de cultivo.....	124
Figura R1.4: Expresión de las fusiones PipB2-CyaA' plasmídicas.....	125
Figura R1.5: Análisis de translocación de fragmentos de PipB2.....	126
Figura R1.6: Representación esquemática del protocolo para generar fusiones CyaA' en el cromosoma bacteriano de manera dirigida.....	128
Figura R1.7: Comprobación de la fusión <i>sseK1::cyaA'</i> en el cromosoma.	129
Figura R1.8: Expresión de las fusiones <i>SseK1-CyaA'</i>	130
Figura R2.1: Análisis del índice de competitividad (IC) en ratones para un mutante nulo <i>sseK1</i>	133
Figura R2.2: Análisis del índice de competitividad (IC) en cultivos celulares para un mutante nulo <i>sseK1</i>	134

Figura R2.3: Expresión de <i>sseK1</i> en diferentes medios de cultivo.....	136
Figura R2.4: Translocación de SseK1 en células de mamíferos.....	138
Figura R2.5: Análisis de la regulación positiva de la expresión de <i>sseK1</i> por el sistema PhoQ/PhoP mediante actividad β -galactosidasa.....	140
Figura R2.6: Análisis de la regulación positiva de la expresión de <i>sseK1</i> por el sistema PhoQ/PhoP mediante inmunoblot.....	141
Figura R2.7: Análisis de la región promotora de <i>sseK1</i>	142
Figura R2.7: Identificación de la caja de unión a PhoP en el promotor de <i>sseK1</i>	143
Figura R2.8: Interacción directa de PhoP fosforilada con la región promotora de <i>sseK1</i>	144
Figura R2.9: Expresión intracelular de <i>sseK1</i> dependiente de PhoP.....	145
Figura R3.1: Esquema del principio básico del sistema del doble híbrido.	151
Figura R3.2: Análisis de las interacciones de SseK1 con proteínas humanas mediante el sistema del doble híbrido en levaduras.	153
Figura R3.3: Expresión de SseK1-3xFLAG en los transfectantes estables.	156
Figura R3.4: Resultados obtenidos con el programa GeneMANIA de análisis de interacciones génicas para los genes con expresión aumentada en presencia de SseK1.	162
Figura R3.5: Resultados obtenidos con el programa GeneMANIA de análisis de interacciones para los genes con expresión disminuida en presencia de SseK1.	165
Figura R3.6: Validación de los datos de transcriptómica.	166
Figura R3.7: Variación de la expresión de los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 en células HeLa durante una infección con las estirpes de <i>Salmonella</i> silvestre y mutante <i>sseK1</i>	167
Figura D.1: Esquema de la translocación de PipB2 en las células hospedadoras.....	172
Figura D.2: Esquema de la translocación de SseK1 en las células hospedadoras.....	177
Figura D.3: Esquema de la regulación de la expresión de <i>sseK1</i> a través del sistema PhoQ/PhoP.	179

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Lista de los efectores conocidos de los sistemas de secreción tipo III de <i>Salmonella</i>	59
Tabla M.1: Estirpes bacterianas usadas en esta tesis.....	71
Tabla M.2: Concentraciones de agentes selectivos y de otros compuestos químicos utilizados en los medios de cultivo bacterianos.....	75
Tabla M.3: Suplementos para el medio mínimo de levaduras.....	76
Tabla M.4: Plásmidos utilizados en esta tesis.....	77
Tabla M.5: Oligonucleótidos empleados en esta tesis.....	87
Tabla M.6: Anticuerpos empleados para la detección de proteínas.....	106
Tabla R1.1: Lista de genes de efectores de T3SS detectados en el escrutinio con mini-Tn5cyaA'.....	120
Tabla R3.1: Genes humanos identificados en el escrutinio de doble híbrido con SseK1.....	152
Tabla R3.2: Análisis de ontología génica de los candidatos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido con SseK1.....	154
Tabla R3.3: Genes humanos que incrementaron su expresión en presencia de SseK1. Se muestran el valor de P y el cambio lineal de la expresión (R).....	157
Tabla R3.4: Genes humanos que disminuyeron su expresión en presencia de SseK1. Se muestran el valor de P y el cambio lineal de la expresión (R).....	158
Tabla R3.5: Análisis de ontología génica de los genes sobreexpresados en presencia de SseK1....	158
Tabla R3.6: Análisis de ontología génica de los genes cuya expresión disminuye en presencia de SseK1.....	163

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC	ATP-Binding Cassette	MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Abs	Absorbancia	MCS	Multiple Cloning Site
ADN	Ácido desoxirribonucleico	MEC	Medio Extracelular
ADNc	ADN complementario	ME	Membrana Externa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	MI	Membrana Interna
Ap	Ampicilina	MOI	Multiplicity of Infection
ARN	Ácido ribonucleico	MP	Membrana Plasmática
ARNm	ARN mensajero	MV	Membrana Vacuolar
BSA	Albúmina de suero bovino	NAPs	<i>Nucleoid-associated proteins</i>
C	Citosol	N-terminal	Animo terminal
C-terminal	Carboxilo terminal	NB	Nutrient Broth
CABIMER	Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa	P	Periplasma
Cm	Cloranfenicol	p.i.	Post-infección
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos	PBS	Tampón fosfato salino
DL50	Dosis letal media	PCR	Polymerase Chain Reaction
DO	Densidad Óptica	PMN	Polimorfonucleares
DTT	Ditriotreitol	ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
FAM	6-carboxifluoresceína	SB	Sample Buffer
FD	Factor de Dilución	SCI	<i>Salmonella enterica</i> centisome 7 genomic island
FLP	Flipasa	SCV	<i>Salmonella</i> -Containing Vacuole
FRT	FLP Recongnition Target	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis
GEF	Guanine Exchange Factor	Sif	<i>Salmonella</i> -Induced filament
Gm	Gentamicina	SIST	<i>Salmonella</i> -Induced Secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3) Tubule
GO	Gene Ontology	SKIP	SifA Kinesin-Interacting Protein
H₂Od	Agua destilada	SN	Sobrenadante
H₂Odd	Agua bidestilada	SOB	Super Optimal Broth
IC	Índice de Competitividad	SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
ICI	Índice de Competitividad en Invasión	SS	Señal de Secreción
ICP	Indice de Competitividad en Proliferación	ST-PCR	Semi-random, Two-step PCR
IL	Interleuquina	SV	<i>Salmonella</i> Sevilla
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido	Tc	Tetraciclina
KLC	Kinesin Light Chain	TxSS	Type x Secretion System
Km	Kanamicina	U	Unidad
LB	Luria-Bertani		
LNT	LAMP1-Negative Tubule		
LPM	Low Phosphate, Low Magnesium-containing Medium		

Lista de abreviaturas

ufc Unidad formadora de
 colonias
UM Unidades Miller

UV Ultravioleta
wt Silvestre

RESUMEN

Salmonella enterica es una especie de bacteria patógena Gram negativa responsable de diversas enfermedades en animales como la gastroenteritis y la fiebre tifoidea. *S. enterica* expresa dos sistemas de secreción tipo III (T3SSs) relacionados con la virulencia codificados en las islas de patogenicidad de *Salmonella* 1 (SPI1) y SPI2, respectivamente. Varias proteínas efectoras, que son secretadas a través de estos sistemas hacia las células hospedadoras eucariotas, interfieren con determinadas vías de transducción de señales para hacer posible la internalización del patógeno y su supervivencia y proliferación en vacuolas. PipB2 y SseK1 son dos de los efectores translocados por estos sistemas de secreción.

En la primera parte de la tesis se generaron, en el genoma de *Salmonella*, fusiones traduccionales con la adenilato ciclasa CyaA de *Bordetella pertussis* como herramientas para el estudio de la translocación de efectores de *Salmonella* hacia el citosol de células de mamífero. El análisis de fusiones aleatorias ha revelado que PipB2 puede translocarse, no sólo a través del T3SS codificado en la SPI2 como estaba descrito, sino también a través del codificado en la SPI1. Esta translocación se ha observado en células epiteliales, en macrófagos y en fibroblastos y requiere los primeros 10 aminoácidos de la proteína.

El resto del trabajo se centró en el estudio del efector SseK1. Mostramos que SseK1 es un factor de virulencia en ratones aunque no es necesario para la invasión ni la proliferación intracelular en cultivos de células de mamífero. La expresión de *sseK1* resultó ser superior en condiciones de inducción de la SPI2 pero fue también significativa en condiciones de inducción de la SPI1. La translocación de SseK1 a células hospedadoras ocurre por ambos T3SS aunque con diferentes patrones y cinéticas dependiendo del tipo celular. El sistema de dos componentes PhoQ/PhoP regula positivamente a *sseK1* gracias a la unión directa de PhoP a la región promotora de este gen.

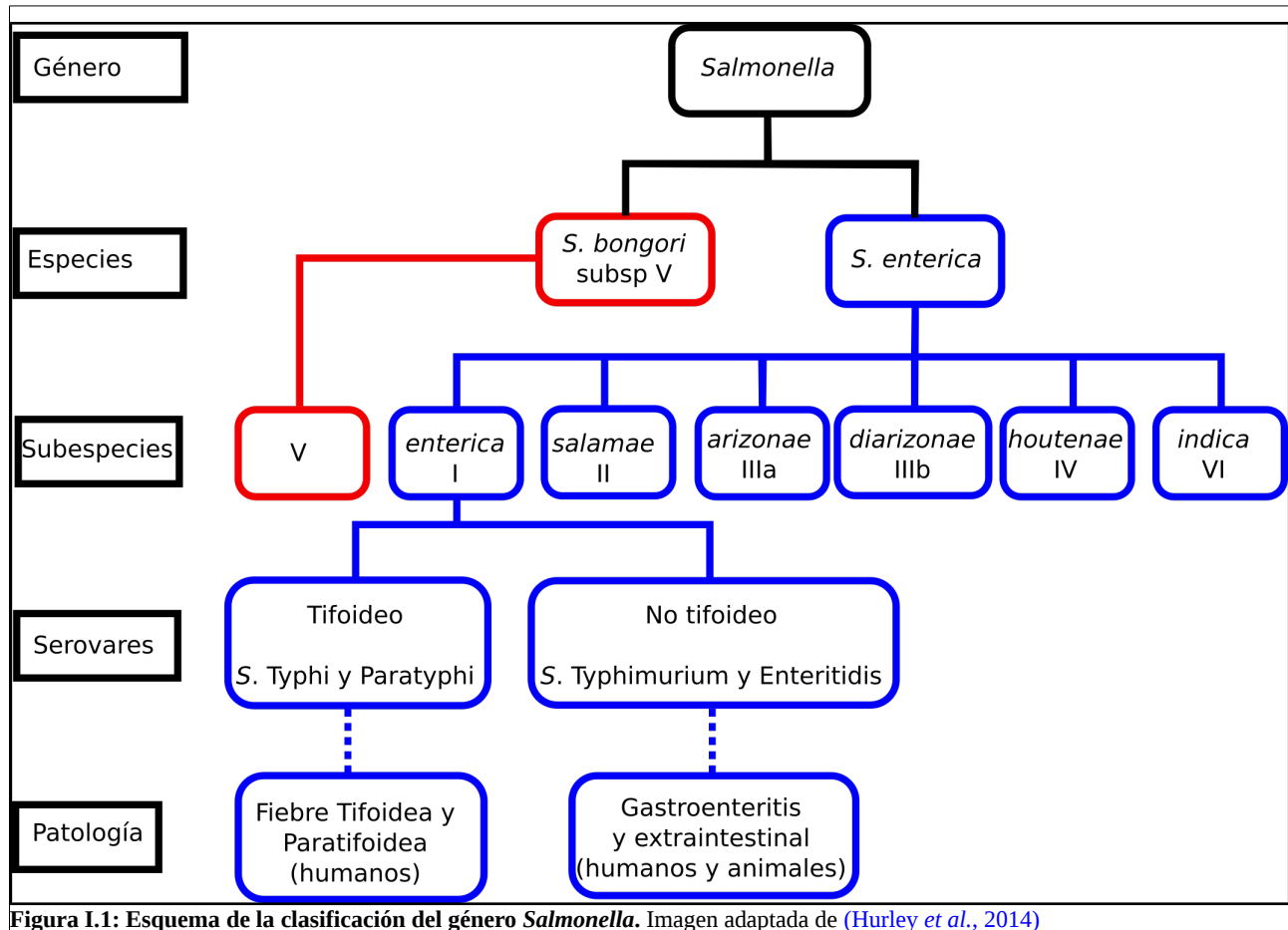
Por último hemos realizado un estudio preliminar de los posibles efectos biológicos del efector SseK1 en la célula hospedadora mediante dos tipos de análisis: (i) Un escrutinio con el sistema del doble híbrido en levaduras para encontrar proteínas de la célula hospedadora capaces de interactuar con SseK1. (ii) Un análisis transcriptómico de células epiteliales humanas HeLa para conocer los efectos de la expresión estable de SseK1 mediante transfección y de su translocación durante una infección con *S. enterica* serovar Typhimurium.

INTRODUCCIÓN

El género *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram negativos. Filogenéticamente, el género *Salmonella*, se encuentra próximo a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*; todos ellos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. La organización genómica del género *Salmonella* es muy similar a gran escala a la de *Escherichia coli* (Groisman & Ochman, 1994; Sanderson *et al.*, 1995). La similitud media entre los genomas de *E. coli* no patogénicas y *S. enterica* serovar Typhimurium alcanza el 80%, según indica la secuenciación (Blattner, 1997; McClelland *et al.*, 2001), aunque, *Salmonella* contiene unas regiones específicas que no se encuentran en los géneros cercanos. De estas regiones algunas están relacionadas con la patogénesis por lo que reciben el nombre de islas de patogenicidad.

Dentro del género *Salmonella* podemos distinguir dos especies: *S. bongori* y *S. enterica* (Tindall *et al.*, 2005), que poseen una similitud entre sus secuencias genómicas del 96 al 99% (Edwards *et al.*, 2002). La especie *S. enterica* se divide, a su vez, en seis subespecies: I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*), y VI (*indica*) (Desai *et al.*, 2013; Porwollik *et al.*, 2004; Tindall *et al.*, 2005). Los miembros de cada subespecie se clasifican en serovares (o serotipos). Las subespecies de *S. enterica* II, IIIa, IIIb, IV y VI, así como, *S. bongori*, se encuentran asociadas a vertebrados de sangre fría; mientras que los miembros de la subespecie I de *S. enterica* se encuentran, más frecuentemente, asociados a aves y mamíferos (Bäumler *et al.*, 1998; Boyd *et al.*, 1996) (Figura I.1). Existen en total más de 2500 serovariedades descritas (Popoff *et al.*, 2004), siendo la subespecie I la que se compone de un mayor número de serovares, con más de 2300 (Porwollik *et al.*, 2004). Para poder distinguir los distintos serovares se usan pruebas inmunológicas con antisueros generados contra los antígenos O y H, los cuales reflejan la variabilidad de la parte expuesta del lipopolisacárido y de la flagelina, respectivamente (Grimont *et al.*, 2007; McQuiston *et al.*, 2004).



Procesos de infección por *S. enterica*

Las infecciones por *Salmonella* en humanos y animales domésticos (mascotas y animales de granja) suceden debido a la ingesta de agua o alimentos contaminados, generalmente poco cocinados o crudos (**Figura I.2**). *Salmonella* es capaz de sobrevivir a la acidez del estómago, producida por los ácidos gástricos, y de evadir los sistemas de defensa que están en el intestino delgado llegando así al epitelio. Es en dicho epitelio donde *Salmonella* produce su invasión, preferentemente a través de las células M, desde donde llegan hasta los linfocitos B y T situados bajo las placas de Peyer. Una vez en el epitelio pueden suceder dos cosas, los serovares que producen enfermedad sistémica atraviesan el epitelio y entran en macrófagos intestinales y se diseminan por el organismo, mientras que los serovares no tifoideos desencadenan una respuesta inflamatoria temprana y localizada que provoca la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) al lumen intestinal dando lugar a diarrea (Haraga et al., 2008).

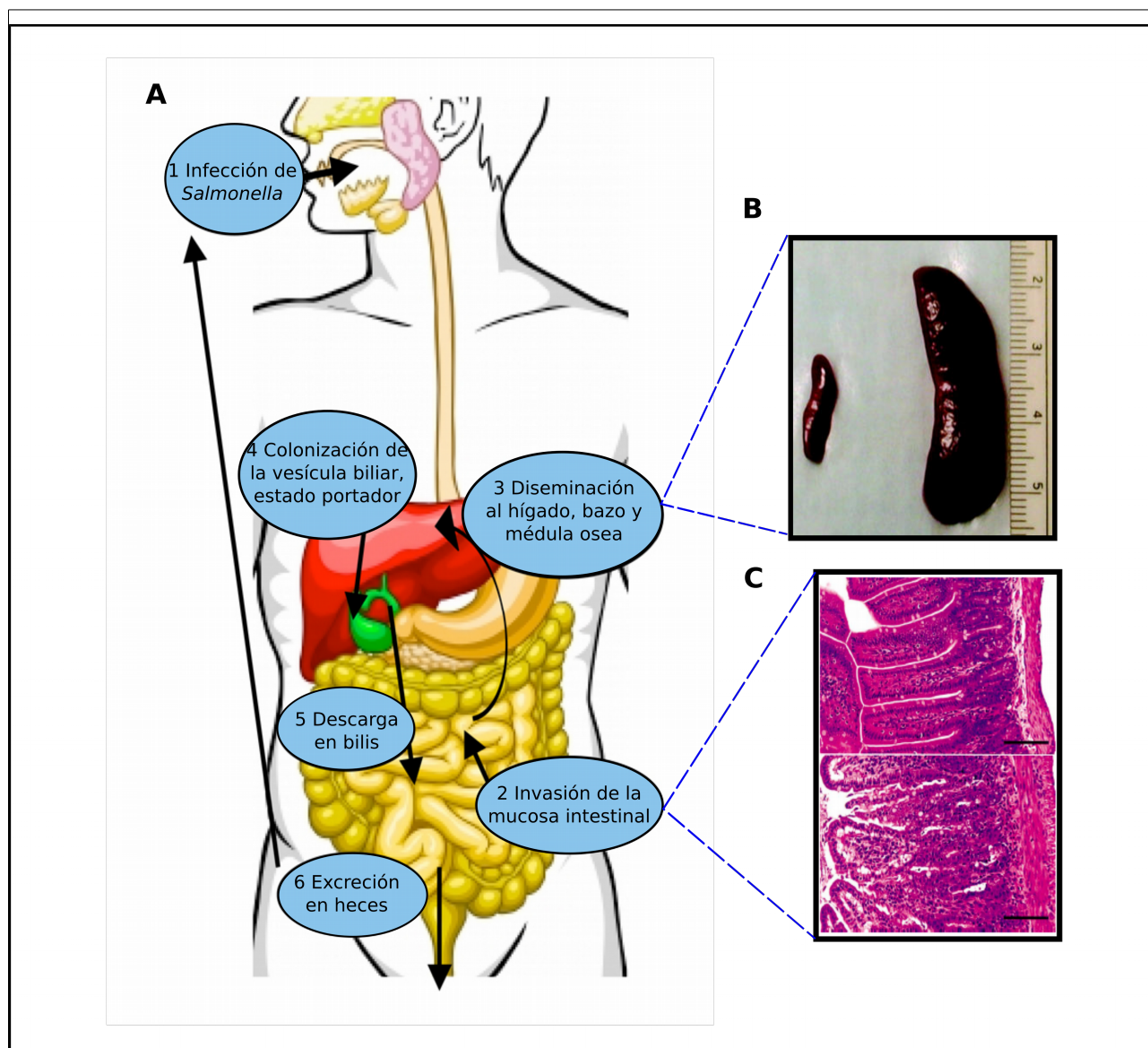


Figura I.2: Patogénesis de la infección por *S. enterica*. (A). La fiebre tifoidea en humanos se adquiere por ingestión de comida o agua contaminadas con *S. enterica* serovar Typhi (1). Las bacterias que sobreviven atraviesan la barrera de ácido gástrico del estómago, invaden las células del epitelio intestinal y migran a través de ellas para alcanzar la lámina propia (2). En la mucosa intestinal, *S. enterica* serovar Typhi es fagocitada por macrófagos y sobrevive en estas células fagocíticas gracias a factores de virulencia, los cuales interfieren con las funciones de la célula hospedadora. Tras la invasión, *S. enterica* serovar Typhi expresa otros factores que inhiben la detección por parte del sistema inmune innato del hospedador. Esto permite a las bacterias diseminarse sistémicamente para colonizar macrófagos del hígado (en rojo), bazo y médula ósea (3). Desde el hígado, las bacterias pueden alcanzar la vesícula biliar (en verde). La infección de la vesícula puede dar lugar a la conversión a un estado de portador asintomático (4). Los portadores de *S. enterica* serovar Typhi continuamente descargan bacilos tifoideos desde la vesícula biliar al intestino delgado mediante la bilis (5) y excretan bacterias viables en sus heces (6), que pueden infectar a otros hospedadores. Imagen adaptada de (Tischler & McKinney, 2010). (B). Se muestra el bazo de un ratón 129sv sin infectar (izquierda) y el bazo con esplenomegalia de un ratón 129sv infectado con *S. enterica* serovar Typhimurium SL1344 durante 60 días (imagen adaptada de (Monack et al., 2004)). (C). Secciones histológicas de íleon de ratón teñidas con hematoxilina y eosina (barra de escala: 100 μ m). La mitad superior corresponde a un control sin infectar; la mitad inferior corresponde al íleon de un ratón BALB/c tras 5 días de infección con una dosis letal de *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 (Santos et al., 2001).

En humanos, los serovares Typhi y Paratyphi producen una enfermedad sistémica llamada fiebre tifoidea cuyas manifestaciones clínicas incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea transitoria o estreñimiento y, en algunas ocasiones, erupción maculopapular. Se estima que la fiebre tifoidea

afecta a 22 millones de personas en todo el mundo llegando a causar en torno a 200000 muertes al año (Crump *et al.*, 2004). Principalmente se producen en países subdesarrollados o en vías de desarrollo debido a deficiencias sanitarias (ej: ausencia de agua potable) y a una manipulación y conservación de los alimentos en condiciones antihigiénicas. El serovar Typhi se establece de manera asintomática en el 1-4% de los pacientes tifoideos, debido a infección persistente de la vesícula biliar (Parry *et al.*, 2002). Estos pacientes, pese a no sufrir los síntomas de la enfermedad, liberan una gran cantidad de bacterias en sus excrementos estando esto relacionado con el mantenimiento de *S. enterica* serovar Typhi a largo plazo en las poblaciones humanas. Está documentado el caso de “María la tifosa”, una portadora asintomática llamada Mary Malone que infectó al menos a 57 personas en Nueva York hasta que fue sometida a cuarentena en 1907 (Tischler & McKinney, 2010).

Las anomalías en el conducto biliar o en la vesícula biliar (ej. cálculos biliares) tienen un papel importante en el desarrollo de la infección crónica. Hay datos que indican que la formación de biofilms de *Salmonella* sobre cálculos renales presentes en la vesícula es un mecanismo que contribuye al establecimiento de este tipo de infecciones crónicas (Crawford *et al.*, 2010). En la mayoría de los casos los antibióticos no son efectivos (Dutta *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 1992) y para eliminar la infección crónica suele ser necesaria la extirpación de la vesícula biliar.

Otros serovares, como Enteritidis y Typhimurium, son responsables de los millones de casos de salmonelosis no tifoidea que se producen anualmente en todo el mundo. Estos serovares, que en humanos causan una gastroenteritis transitoria de gravedad muy variable (pero que, generalmente, no requiere tratamiento para la remisión), también infectan a una amplia gama de animales domésticos (ej. aves, ganado vacuno y cerdos) en los que pueden producir diversos tipos de infecciones, desde asintomáticas a sistémicas.

En el África subsahariana son frecuentes las salmonelosis no tifoideas complicadas con bacteriemia (Morpeth *et al.*, 2009; De Wit *et al.*, 1988). Su incidencia ha aumentado en asociación con las infecciones por VIH y por *Plasmodium falciparum* (Bronzan *et al.*, 2007). Ciertos serovares no tifoideos de *Salmonella* pueden causar colecistitis persistente o crónica (Lalitha & John, 1994). Estas infecciones persistentes sintomáticas también son difíciles de erradicar, siendo necesaria la extirpación de la vesícula.

Modelo de ratón para el estudio de la virulencia de *Salmonella*

S. enterica serovar Typhimurium es el organismo modelo más utilizado en el estudio de las infecciones de *Salmonella*. Este serovar infecta una gran variedad de hospedadores. En ciertas razas de ratón doméstico, *Mus musculus*, produce una enfermedad similar a la fiebre tifoidea, que sirve como modelo de estudio para las infecciones sistémicas causadas por el serovar Typhi en humanos. **(Figura I.3).**

Los ratones BALB/c son particularmente susceptibles a la infección por *Salmonella* ya que portan una mutación en el locus que codifica la proteína Nramp1, un componente de la resistencia o susceptibilidad innata a infecciones causadas por patógenos intracelulares. La expresión de este locus está restringida a monocitos y es necesaria para controlar la replicación intracelular de microorganismos como *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Leishmania* (Bellamy, 1999; Govoni & Gros, 1998; Gruenheid *et al.*, 1997). En el modelo clásico de ratón, *Salmonella* se multiplica en el tubo digestivo y llega al extremo distal del intestino delgado, el íleon, donde se adhiere preferentemente a las células M del epitelio intestinal (Jones *et al.*, 1994). Tras la invasión, *Salmonella* atraviesa el epitelio intestinal y es fagocitada por macrófagos, donde sobrevive y se replica gracias a la evasión de las funciones fagocíticas de este tipo celular. Posteriormente, la bacteria se disemina a otros órganos a través del torrente sanguíneo. En nuestros experimentos hemos estudiado el número de bacterias encontradas en el bazo tras la infección oral e intraperitoneal en este modelo de ratón **(Figura I.3).**

El método clásico para identificar un mutante atenuado en el modelo de ratón es la determinación de su dosis letal media (DL50) comparada con la DL50 de la estirpe silvestre (Reed & Muench, 1938). Sin embargo, un procedimiento más sensible y que requiere un menor número de ratones consiste en infectar el mismo ratón con una mezcla de dos estirpes, generalmente una mutante y una silvestre, para obtener un índice de competitividad (IC) (Freter *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1987). Este modelo permite además el estudio de interacciones génicas *in vivo* mediante el uso de infecciones mixta con mutantes dobles y simples (Beuzón & Holden, 2001).

Una limitación del modelo de ratón es que el serovar Typhimurium no produce colitis en este organismo, pero se ha demostrado que los ratones tratados previamente con antibióticos desarrollan inflamación intestinal aguda en respuesta a la infección oral con *S. enterica* serovar Typhimurium

(Barthel *et al.*, 2003). Estos estudios han abierto la posibilidad de utilizar el ratón como modelo para el estudio de la gastroenteritis [revisado en (Hapfelmeier & Hardt, 2005)].

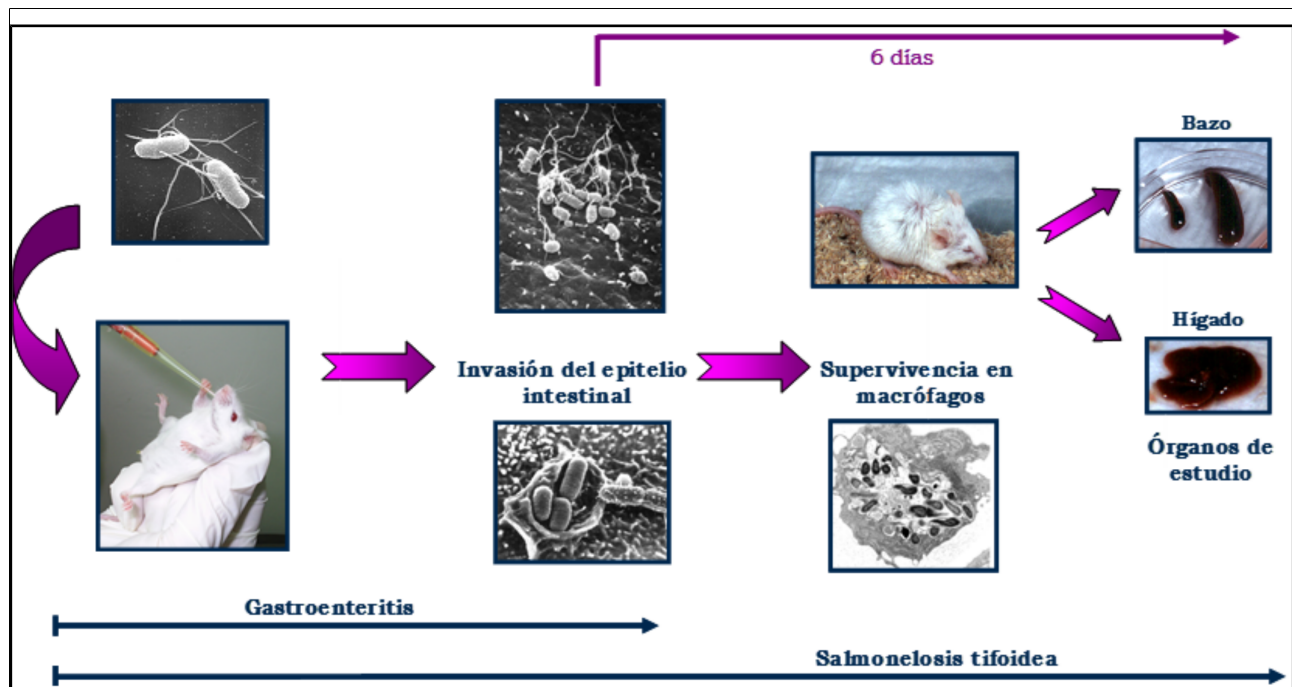


Figura I.3: Modelo animal para el estudio de la patogénesis de *Salmonella*. Se muestra una infección oral en la que, tras 5-6 días de infección, se extraen los bazo para el análisis bacteriano. En el caso de infecciones intraperitoneales, la recogida se realiza 48 h tras la inyección.

Modelo de líneas celulares para el estudio de la virulencia de *Salmonella*

Junto a los modelos *in vivo*, se ha utilizado una gran variedad de líneas celulares eucarióticas como modelos *in vitro* para el estudio de la invasión (líneas epiteliales) o de la supervivencia y proliferación intracelulares (líneas fagocíticas, líneas epiteliales y de fibroblastos). El método más usado para estos estudios *in vitro* es el de la protección frente a gentamicina. Este método se basa en la dificultad de la gentamicina para atravesar la membrana celular eucariótica (Elsinghorst, 1994). Después de una infección *in vitro*, las bacterias extracelulares se eliminan mediante un tratamiento con gentamicina y las bacterias intracelulares se siembran con las diluciones apropiadas para llevar a cabo recuentos que permitan calcular el porcentaje de invasión con respecto al inóculo inicial. Por otro lado, la tasa de proliferación intracelular se calcula como la razón entre el número de bacterias intracelulares viables presentes tras 24 h de infección y el número de bacterias intracelulares que había justo después del tratamiento con gentamicina (Cano *et al.*, 2001). Dada la variabilidad que

presentan los resultados de estos experimentos *in vitro*, se ha propuesto una modificación del método de protección frente a gentamicina que incorpora las ventajas de las infecciones mixtas y permite el cálculo de un índice de competitividad para invasión y para proliferación (Segura *et al.*, 2004a).

Factores de virulencia

Se han propuesto cuatro mecanismos genéticos para explicar las diferencias fenotípicas entre especies bacterianas relacionadas, como *E. coli* y *S. enterica*, que difieren en su potencial patogénico: (i) la presencia de genes de virulencia específicos; (ii) la ausencia en las especies patógenas de un gen supresor de virulencia que inhiba o interfiera con la actividad de los factores de virulencia, como ocurre en el caso de la pérdida del operón *lac* en *Salmonella* (Eswarappa *et al.*, 2009); (iii) la existencia de diferencias alélicas entre genes homólogos; y (iv), la regulación diferencial de secuencias homólogas (Groisman & Ochman, 1994).

Los patógenos a menudo portan grupos de genes cromosómicos que codifican funciones de virulencia, denominados “islas de patogenicidad”, que están ausentes en las especies no patógenas relacionadas (Dobrindt *et al.*, 2004). Por ejemplo, *Salmonella* contiene distintas islas de patogenicidad (SPIs o *Salmonella Pathogenicity Islands*) que la dotan de la habilidad para invadir células epiteliales y sobrevivir dentro de células fagocíticas. Estas islas están ausentes en la comensal *E. coli*, la cual ni invade ni puede sobrevivir en células de mamífero. Se han identificado al menos 21 SPIs en diversos serovares de *S. enterica* (Sabbagh *et al.*, 2010). Existen varios indicios que sugieren que estas regiones se han adquirido por procesos de transferencia horizontal: (i) a menudo presentan un porcentaje en G+C distinto del resto del genoma; (ii) están flanqueados por genes que se encuentran contiguos en especies cercanas evolutivamente y no patógenas; y (iii), en algunos casos muestran secuencias en los extremos con homología a elementos de inserción, transposones y profagos, lo que sugiere un posible mecanismo de adquisición (Groisman & Ochman, 1996; Hacker & Kaper, 2000).

Además de las SPIs, se pueden encontrar otras regiones más pequeñas, a veces denominadas “islotes de patogenicidad”, relacionadas con la virulencia y específicas de *Salmonella* (Groisman & Ochman, 1997). También hay genes de virulencia asociados a profagos (Figuroa-Bossi *et al.*, 2001). Además algunos miembros del género *Salmonella* portan un plásmido requerido para la

infección sistémica, el “plásmido de virulencia”, cuyo tamaño varía entre 50 y 90 kb, aunque sólo una región de 7,8 kb llamada *spv* (de *Salmonella plasmid virulence*) es la necesaria para conferir el fenotipo de virulencia en ratones BALB/c (Gulig *et al.*, 1993; Rotger & Casadesús, 1999).

Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI1)

La SPI1 desempeña un papel crucial tanto en la gastroenteritis como en la infección sistémica causadas por *Salmonella* (Hansen-Wester & Hensel, 2001). Entre los genes que se codifican en esta isla encontramos los genes necesarios para montar el T3SS1, un aparato de virulencia importante a través del cual el patógeno inyecta proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedadora, así como algunos efectores secretados por el T3SS1 (Figura I.4). La SPI1 interviene en múltiples procesos, tales como citotoxicidad en macrófagos (Chen *et al.*, 1996), invasión de células epiteliales (Galán, 1999), inflamación y secreción de fluidos en el íleon (Hobbie *et al.*, 1997), secreción de citoquinas y prevención de la apoptosis en células epiteliales (Knodler *et al.*, 2005).

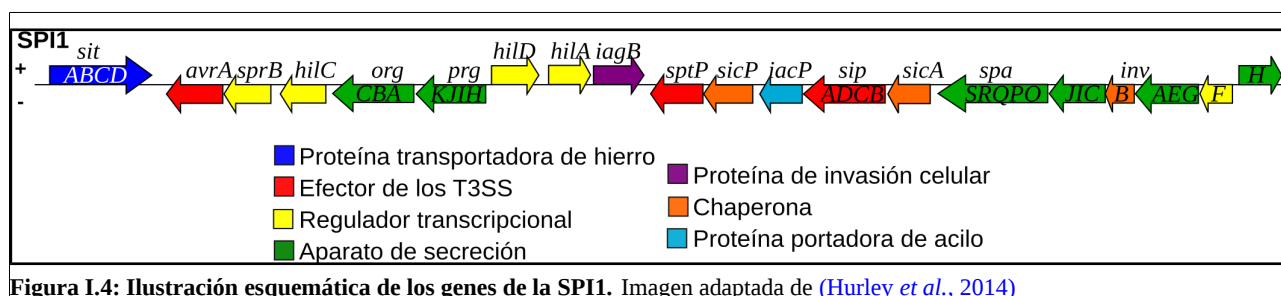


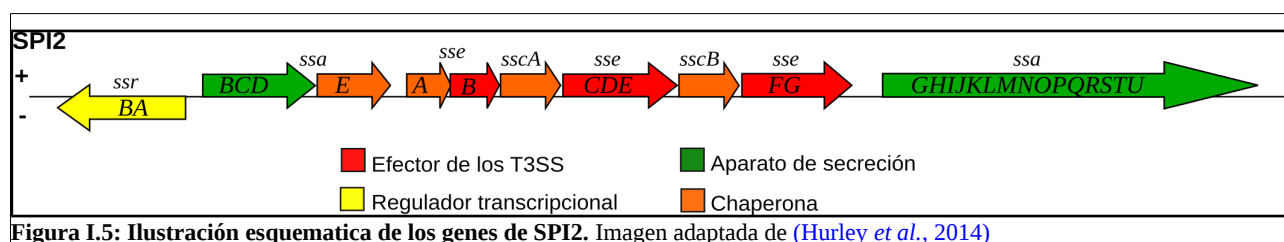
Figura I.4: Ilustración esquemática de los genes de la SPI1. Imagen adaptada de (Hurley *et al.*, 2014)

Salmonella Pathogenicity Island 2 (SPI2)

Al igual que la SPI1, la SPI2 codifica otro T3SS importante para la virulencia de *Salmonella*. Las proteínas codificadas en la SPI2 (Figura I.5) son indispensables para la infección sistémica, debido a que permiten la supervivencia intracelular de *Salmonella* dentro de las células hospedadoras, pero no para la gastroenteritis. La formación y el mantenimiento de la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV o *Salmonella-containing vacuole*) conllevan una serie de eventos controlados por esta isla de patogenicidad (Haraga *et al.*, 2008). La SPI2 confiere protección frente a especies reactivas de oxígeno o ROS (Janssen *et al.*, 2003), así como a intermediarios reactivos del nitrógeno o RNI (Chakravorty *et al.*, 2002) dentro de macrófagos. La reductasa de tetrionato

codificada en la SPI2 actúa sobre el tetrationato para generar tiosulfato, el cual ejerce como donador de electrones alternativo para *Salmonella* en ambientes que contienen tetrationato, como el intestino humano, el suelo o cadáveres en descomposición (Hensel *et al.*, 1999; Winter *et al.*, 2010).

Aunque se esperaría que los genes de las SPI1 y SPI2 no se expresasen simultáneamente, ya que poseen diferentes funciones, existen pruebas de solapamiento espaciotemporal en la expresión de ambas. Dos ejemplos significativos de ello son: (i) la expresión preventiva de la SPI2 en el lumen intestinal antes de la invasión de las células epiteliales, con el fin de preparar a *Salmonella* para atravesar el lado basal del epitelio hasta la lámina propia (Müller *et al.*, 2012) y para el inminente estrés intracelular (Brown *et al.*, 2005), y (ii) la expresión residual de la SPI1 tras la internalización por macrófagos para contrarrestar la respuesta inmune del hospedador mediante la supresión de la expresión de citoquinas (Pavlova *et al.*, 2011).



Otras islas de patogenicidad

De las 21 SPIs identificadas en *S. enterica*, 6 están en el serovar Typhi pero no en el serovar Typhimurium (SPI7, SPI8, SPI10, SPI15, SPI17 y SPI18, aunque SPI8 y SPI10 tienen regiones equivalentes en Typhimurium con genes completamente distintos), 11 están tanto en el serovar Typhi como en el serovar Typhimurium (SPI1 a SPI6, SPI9, SPI11, SPI12, SPI13 y SPI16), y tan sólo 1 es específica de Typhimurium (Sabbagh *et al.*, 2010).

A continuación se muestran algunas características de las islas mejor estudiadas, fuera de las SPI1 y SPI2:

(i) SPI3: Permite a *Salmonella* sobrevivir en condiciones de bajo Mg^{2+} , gracias a la proteína MgtC, y se requiere para la supervivencia dentro de macrófagos, así como para la infección sistémica en el modelo de ratón (Blanc-Potard *et al.*, 1999).

(ii) SPI4: Codifica un sistema de secreción de tipo I (T1SS) que secreta una proteína, llamada SiiE, de 600 kDa ([Morgan et al., 2007](#)) y contribuye a la virulencia ([Kiss et al., 2007](#)).

(iii) SPI5: Codifica SopB y PipB, dos efectores translocados por los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella* codificados en la SPI1 (T3SS1) y en la SPI2 (T3SS2), respectivamente ([Knodler et al., 2002](#)).

(iv) SPI6: Codifica un sistema de secreción tipo VI (T6SS), una fimbria y una invasina ([Lambert & Smith, 2008](#); [Townsend et al., 2001](#)). Recientemente se ha descrito el silenciamiento de los genes de la SPI6 a través de la proteína H-NS y su implicación en el duelo entre subpoblaciones de *Salmonella enterica* durante la infección ([Brunet et al., 2015](#)).

(v) SPI7: Es la mayor isla identificada hasta el momento, con 134 kb, muestra como función principal la de síntesis y secreción del antígeno Vi. Además contiene los genes que codifican el efector del T3SS1 SopE y *pili* tipo IVB ([Seth-Smith, 2008](#)). Esta isla se encuentra en los serovares Typhi, Paratyphi C y algunas estirpes del serovar Dublin. Es un ejemplo de isla de patogenicidad escindible por recombinación específica de sitio ([Nieto et al., 2016](#)).

(vi) SPI8: En *S. enterica* serovar Typhi codifica dos proteínas de inmunidad frente a bacteriocinas ([Parkhill et al., 2001](#)).

(vii) SPI9: Codifica un T1SS parecido al de la SPI4 ([Parkhill et al., 2001](#)).

(viii) SPI10: En *S. enterica* serovar Typhi contiene un profago denominado ST46 ([Parkhill et al., 2001](#)) el cual es portador de genes para quinasas y fosfatasa de Ser/Thr de tipo eucariótico que están implicadas en la supervivencia del patógeno en macrófagos ([Faucher et al., 2008](#)).

Plásmido de virulencia

Algunos miembros del género *Salmonella* portan un plásmido, cuyo tamaño varía entre 50 y 90 kb, requerido para la infección sistémica. Este plásmido posee una región de 7,8 kb, llamada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), que es la necesaria para conferir el fenotipo de virulencia en ratones BALB/c ([Gulig et al., 1993](#); [Rotger & Casadesús, 1999](#)). En este plásmido se encuentran los genes *spv*, cuyos productos se secretan a través de los T3SSs y son esenciales para la virulencia de *S. enterica* serovar Typhimurium ([Browne et al., 2008](#)). El efector SpvB juega un papel importante

en la inhibición de la autofagia de la célula hospedadora (Chu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016) y SpvD en la inhibición de la respuesta inflamatoria (Rolhion *et al.*, 2016). Por otro lado, las fimbrias Pef, codificadas también en el plásmido de virulencia, median la adhesión a células epiteliales del intestino e inducen una respuesta proinflamatoria (Bäumler *et al.*, 1996; Chessa *et al.*, 2008). Se ha descrito además un ARN pequeño codificado en el plásmido y denominado lesR-1 que se expresa cuando *Salmonella* está en el interior de los fibroblastos (Gonzalo-Asensio *et al.*, 2013).

Adhesinas

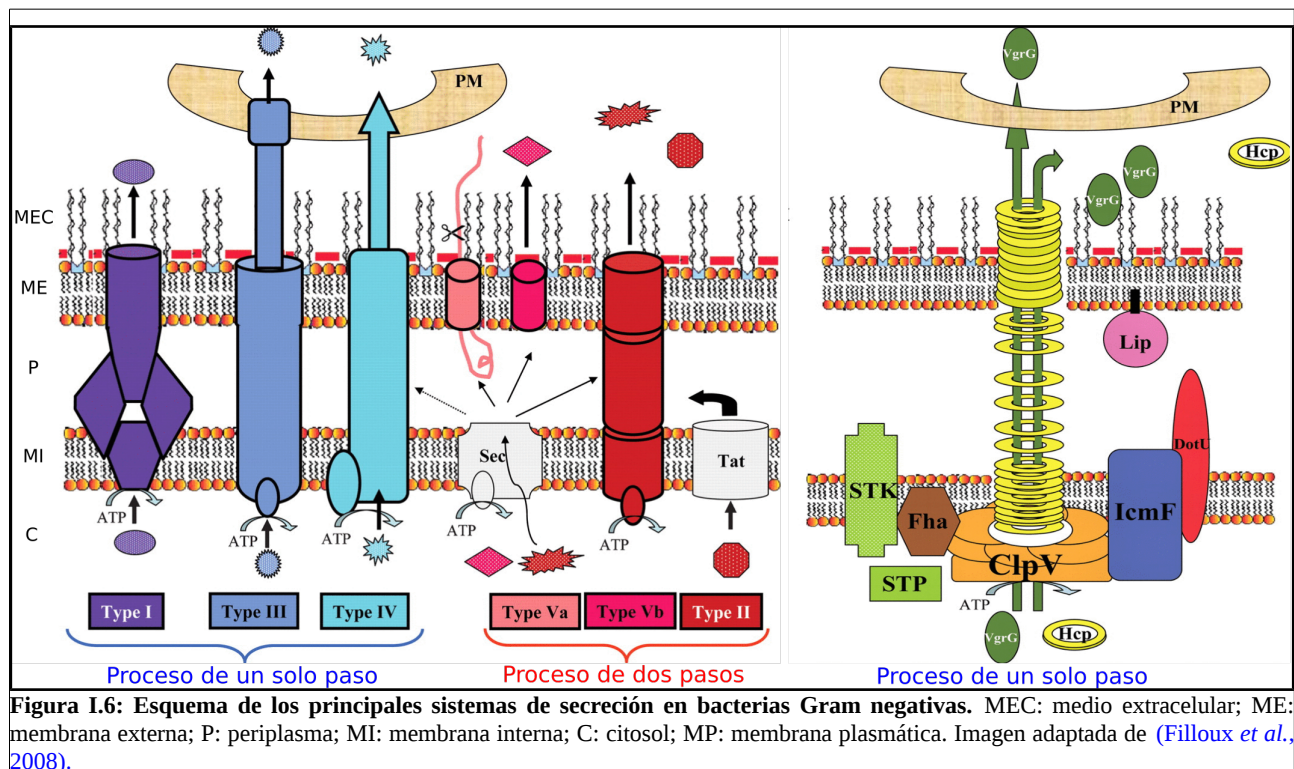
El acoplamiento de la bacteria a la célula diana consta de muchos pasos mediados por varias adhesinas (Wagner & Hensel, 2011) codificadas por genes de las fimbrias como *fim* (Lockman & Curtiss, 1992), *pef* (Bäumler *et al.*, 1996), *lpf* (Bäumler & Heffron, 1995) y *agf* (Grund & Weber, 1988), o genes no fimbriales como los autotransportadores *misL* (Dorsey *et al.*, 2005) y *shdA* (Kingsley *et al.*, 2002) o los genes *siiE* (Barlag & Hensel, 2015; Gerlach & Hensel, 2007) y *bapA* (Latasa *et al.*, 2005), que codifican adhesinas grandes secretadas por T1SS. Cada adhesina media la adhesión a un tipo celular en particular, debido a la especificidad por los receptores presentes en la superficie de las células diana (Misselwitz *et al.*, 2011). El mismo tipo celular puede ser atacado por diferentes adhesinas durante la progresión de la adhesión (Misselwitz *et al.*, 2011). Además, el flagelo se requiere para alcanzar e invadir la célula diana, así como para ayudar en la adhesión junto con las fimbrias (Dibb-Fuller *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2001).

Sistemas de secreción

Las bacterias Gram negativas poseen diversas maquinarias encargadas de transportar sustratos a través de sus membranas celulares, los sistemas de secreción, y que son esenciales para la virulencia bacteriana. Las bacterias las emplean con el fin de conseguir nutrientes, transportar proteínas, ácidos nucleicos y toxinas, y ensamblar estructuras en la superficie de la bacteria del tipo de los *pilis* y las fimbrias. Aproximadamente el 3% del proteoma total de *Salmonella* constituye proteínas de secreción, al conjunto de estas proteínas se le conoce como secretoma (Arnold *et al.*, 2009).

En las bacterias Gram negativas podemos encontrar al menos siete sistemas de secreción diferentes: los T1SS-T6SS y el sistema *chaperone-ushe* o CU (Costa *et al.*, 2015; Filloux *et al.*,

2008; Fronzes *et al.*, 2009; Gerlach & Hensel, 2007; Rêgo *et al.*, 2010; Saier, 2006). Estos sistemas utilizan dos mecanismos principales de transporte: (i) de un solo paso o independiente de Sec, donde las proteínas se exportan directamente desde el citoplasma al exterior celular, y (ii) de dos pasos o dependientes de Sec (o Tat), donde las proteínas se exportan primero a través de la membrana interna hasta el periplasma y luego atraviesan la membrana externa (Figura I.6).



T1SS

Son sistemas heterotriméricos que facilitan el paso de proteínas de diferente tamaño a través de la envuelta celular. Consisten en un transportador de membrana interna ABC (*ATP-binding cassette*) que proporciona la energía para la secreción proteica, una proteína de membrana externa, que forma el poro, y una proteína adaptadora que hace de puente entre la membrana interna (MI) y la membrana externa (ME). Secretan sustratos en un solo paso, sin un intermediario periplásmico estable (Koronakis *et al.*, 1991). Los T1SSs están involucrados en la secreción de citotoxinas pertenecientes a la familia de las proteínas RTX (*repeats-in-toxin*), proteínas de la superficie celular, proteasas, lipasas, bacteriocinas y proteínas de hemo-adquisición [revisado en (Omori & Idei, 2003)]. Como ejemplo, SPI-4 de *Salmonella* codifica un T1SS, el cual secreta la proteína SiiE, una

adhesina de 600 kDa que media el contacto íntimo de la bacteria con las microvellosidades de la membrana apical de las células intestinales y colabora con el T3SS1 ayudando a las bacterias a atravesar la barrera epitelial (Gerlach et al., 2007, 2008), recientemente se ha descrito la importancia de las proteínas SiiA y SiiB en el control de la adhesión mediada por el T1SS de la SPI-4 (Wille et al., 2014). BapA es otra proteína de *Salmonella*, con función de adhesina, que se secreta por medio de un T1SS. Contribuye a la formación de biopelículas y a la invasión de *S. enterica* serovar Enteritidis (Latasa et al., 2005).

T2SS

Son maquinarias multicomponentes que usan un mecanismo de dos pasos para la translocación: (i) la proteína efectora precursora se transloca a través de la membrana interna mediante el translocón Sec (Gold et al., 2007) o la vía Tat (Voulhoux et al., 2001). (ii) el efector se transloca desde el periplasma por el T2SS a través de la membrana externa. El translocón T2SS consta de 12-16 proteínas (Filloux, 2004) que se encuentran en ambas membranas, en el citoplasma y en el periplasma. Este sistema se encuentra en patógenos como *Erwinia*, *Legionella*, *Vibrio* o *Yersinia* [revisado en (Korotkov et al., 2012)]; sin embargo, no se encuentra en otros como *Salmonella* o *Shigella*.

T3SS

Los T3SSs, conocidos como inyectoras o agujas moleculares, median un mecanismo de secreción de un solo paso, independiente de Sec, y son utilizados por muchos simbiontes y patógenos Gram negativos de animales y plantas, entre ellos miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Rhizobium*, *Escherichia* y *Pseudomonas*. Estos sistemas están genética, estructural y funcionalmente relacionados con los flagelos bacterianos (Cornelis & Van Gijsegem, 2000; Diepold & Armitage, 2015; Galán *et al.*, 2014; Macnab, 2003; Tampakaki *et al.*, 2004). Transportan proteínas, conocidas como efectores, desde el citoplasma de la bacteria hasta el citoplasma de la célula eucariota hospedadora, atravesando tanto la membrana interna como la externa bacteriana (Cornelis, 2006; Galán & Wolf-Watz, 2006). Pese a que los T3SSs de los diversos géneros de patógenos tienen diferente repertorio de efectores, mantienen semejanzas funcionales, de modo que un T3SS de un género bacteriano puede secretar y translocar efectores de otro género bacteriano distinto (Ho & Starnbach, 2005).

Estas estructuras consisten en un cuerpo basal, con un anillo en la membrana interna, un cuello que atraviesa la zona periplásmica y un anillo externo que se expande desde la membrana externa de la bacteria, y una aguja, que se extiende desde la membrana externa y se localiza en el espacio extracelular, a través de la cual se secretan los efectores. Para ser funcional, un T3SS requiere elementos adicionales tales como un complejo regulador citosólico, ligado al cuerpo basal, una varilla interna que constituye la base de la aguja, y un translocón, que es un complejo proteico que forma un poro en la membrana del hospedador, la cual está asociada a la punta de la aguja (Cornelis, 2006). La secreción es promovida por una ATPasa (Akeda & Galán, 2005), aunque la fuerza protón motriz podría ser la fuente primaria de energía para la secreción (Lee & Rietsch, 2015).

El proceso de translocación típico ocurre desde la bacteria hasta el citosol del hospedador. Sin embargo, existen pruebas que demuestran que los efectores localizados en la superficie bacteriana también pueden translocarse. Dicho transporte, demostrado para el efector YopH de *Y. pseudotuberculosis*, ocurre también en *trans* a través del T3SS1 de *Salmonella* (Akopyan *et al.*, 2011).

T4SS

Estos son sistemas versátiles, encontrados tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas, que secretan una amplia gama de sustratos, desde proteínas simples a complejos proteína-proteína y proteína-ADN (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Llosa *et al.*, 2009). Podemos definir tres familias de T4SS, según su función: (i) sistemas conjugativos que transfieren plásmidos y transposones desde una bacteria donadora a una bacteria receptora; (ii) sistemas de entrada o salida de ADN; y (iii), sistemas de translocación de efectores que transportan ADN o proteínas al interior de células eucarióticas y están implicados en la virulencia de muchos patógenos Gram negativos (Fronzes *et al.*, 2009). Debido al solapamiento funcional entre ciertos T4SS, recientemente se ha propuesto una clasificación más simple que divide a la mayoría de estos sistemas en dos clases: IVa, ejemplificado por el sistema VirB/D4 de *Agrobacterium tumefaciens*, y IVb, ejemplificado por el sistema Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Chandran Darbari & Waksman, 2015; Kubori & Nagai, 2015).

T5SS

Estos sistemas translocan los sustratos en dos pasos e incluyen 5 subcategorías denominadas de Va a Ve. Todas, excepto el tipo Vb, consisten en un solo polipéptido que atraviesa la membrana interna usando el sistema Sec y que posee un dominio translocador que forma un poro en forma de barril β en la membrana externa a través del cual se secreta el dominio pasajero. Por eso a todos estos sistemas se les conoce como autotransportadores. El tipo Vb funciona de manera similar pero el dominio pasajero y el transportador son dos polipéptidos diferentes (Fan *et al.*, 2016). Aproximadamente 700 proteínas, con funciones que incluyen, adherencia, auto-agregación, citotoxicidad, invasión, resistencia a suero, diseminación célula a célula y proteólisis, usan estos sistemas de secreción para atravesar las membranas internas y externa de la bacteria (Henderson & Nataro, 2001; Mazar & Cotter, 2007). Entre los autotransportadores bien estudiados de *Salmonella* se encuentran las proteínas ShdA (Kingsley *et al.*, 2000), MisL (Blanc-Potard *et al.*, 1999) y SadA (Raghunathan *et al.*, 2011). ShdA se expresa cuando la bacteria está en el intestino del hospedador y presenta un dominio que media la adhesión a fibronectina. Dicha proteína es importante para la persistencia de *Salmonella* y su presencia a largo plazo en las heces de ratón (Kingsley *et al.*, 2002). MisL, que se codifica en la SPI3, es una adhesina capaz de unirse a fibronectina y está implicada en

la colonización del intestino (Dorsey *et al.*, 2005). SadA es un ejemplo de autotransportador trimérico (tipo Vc). Se trata de otra adhesina cuya expresión contribuye a agregación celular, formación de biofilm y aumento de la adhesión a células intestinales humanas Caco-2 (Raghunathan *et al.*, 2011).

T6SS

Son complejos de secreción de un solo paso definidos en el año 2006 (Pukatzki *et al.*, 2006) y ampliamente distribuidos entre las proteobacterias (Boyer *et al.*, 2009) incluyendo patógenos como *P. aeruginosa*, *E. coli* enteroagregativa, *S. enterica* serovar Typhimurium, *Vibrio cholerae* y *Yersinia pestis*. Son sistemas compuestos de 13 subunidades esenciales y varios componentes accesorios (Cascales, 2008; Pukatzki *et al.*, 2009). Estos sistemas pueden translocar proteínas tanto a células eucarióticas como procarióticas, por lo que tienen un papel tanto en virulencia como en interacciones con otras bacterias (Ho *et al.*, 2014). En *Salmonella*, el primer T6SS se descubrió con la caracterización de la SPI6 (Folkesson *et al.*, 2002), antes llamada SCI (*Salmonella enterica* centisome 7 genomic island). Este sistema limita el crecimiento intracelular en macrófagos, lo que produce una menor tasa de mortalidad en ratones (Parsons & Heffron, 2005). Además, contribuye a la colonización gastrointestinal y a la diseminación sistémica en pollos (Pezoa *et al.*, 2013). Existen otros tres T6SS en *S. enterica* (Blondel *et al.*, 2009), encontrados en las SPI19, SPI20 y SPI21. La mayoría de los serovares posee tan sólo un T6SS, codificado en SPI6 o en SPI19, aunque algunos pueden albergar dos.

Sistemas CU

Son sistemas de translocación de dos pasos, muy simples, que sólo requieren dos proteínas: (i) una chaperona periplásmica; y, (ii) una proteína acomodadora de membrana externa. Estos sistemas son responsables del ensamblaje y secreción de *pili* o fimbrias, estructuras formadas por múltiples subunidades que actúan como factores de virulencia en: (i) el reconocimiento; (ii) la adhesión e invasión del hospedador; y, (iii) la formación de biopelículas [revisado en (Geibel & Waksman, 2014)].

Los T3SS de *Salmonella*

Las dos especies del género *Salmonella* presentan el T3SS codificado en la SPI1 (T3SS1), además la especie *S. enterica* porta un T3SS adicional (T3SS2) codificado en una isla de patogenicidad diferente, la SPI2, por lo que se cree que ha sido adquirido más recientemente (Bäumler, 1997). Ambos sistemas de secreción desempeñan un papel importante en la interacción con el hospedador durante la patogénesis. El T3SS1 facilita la invasión de células no fagocíticas y contribuye al traspaso del epitelio; el T3SS2 se requiere para la replicación bacteriana dentro de muchos tipos celulares eucarióticos (Aussel *et al.*, 2011; Geddes *et al.*, 2007) de los diversos órganos alcanzados durante la infección sistémica (Carter & Collins, 1974).

T3SS1

En cada célula bacteriana podemos encontrar entre 10 y 100 complejos de este tipo (Kubori *et al.*, 1998) localizados a lo largo del eje bacteriano, con una distribución similar a la de los flagelos. Esto permite a las bacterias extracelulares aumentar la probabilidad de establecer contacto con las células hospedadoras para la inyección de proteínas efectoras. Las subestructuras del T3SS1 son complejos proteicos homo- o heteromultiméricos (Figuras I.7 e I.9). El anillo interno consta de 24 subunidades de PrgK y PrgH; el anillo externo y el cuello se componen de 15 copias de InvG (Schraidt & Marlovits, 2011; Schraidt *et al.*, 2010). La aguja está compuesta de réplicas de la proteína PrgI, con una disposición helicoidal similar a la del filamento flagelar. El lumen central de la aguja, por el cual se secretan los efectores, tiene un diámetro de unos 25 Å (Loquet *et al.*, 2012). La aguja está conectada a la varilla interna, la cual está formada por PrgJ. Esta subestructura atraviesa el cuerpo basal y controla la longitud de la aguja (Marlovits *et al.*, 2006). La punta de la aguja se forma con 5 moléculas de SipD que interaccionan con PrgI mediante cambios conformacionales de ambas proteínas (Lunelli *et al.*, 2011; Rathinavelan *et al.*, 2011).

T3SS2

En cada célula bacteriana existen únicamente una o dos copias de este sistema y se encuentra localizado en los polos (Chakravorty *et al.*, 2005). Debido a que este sistema se activa cuando

Salmonella está dentro de la SCV, donde las membranas de la bacteria están ya en contacto con la membrana de la célula diana, probablemente sea suficiente un único inyector para la translocación de los efectores. Esta estructura multiproteica (**Figura I.7 e I.9**) atraviesa la envuelta bacteriana y termina en un translocón, insertado en la membrana vacuolar de la célula hospedadora ([Chakravortty et al., 2005](#)) y formado por las proteínas SseB, SseC y SseD ([Nikolaus et al., 2001](#)). Los mutantes *ssaG*, *ssaH* y *ssaI* son incapaces de formar estructuras superficiales, lo que sugiere una función para SsaG, SsaH y SsaI en la formación de un T3SS2 funcional y de estructuras de superficie ([Chakravortty et al., 2005](#)). La secreción selectiva de este sistema está controlada por un complejo regulador formado por tres proteínas (SsaL, SsaM y SipC), el cual se localiza en el citosol bacteriano, probablemente en contacto con el cuerpo basal ([Yu et al., 2004, 2010](#)). SsaQ constituye la plataforma citoplasmática (anillo C) conectada a la base del sistema de secreción ([Diepold et al., 2010; Morita-Ishihara et al., 2006](#)).

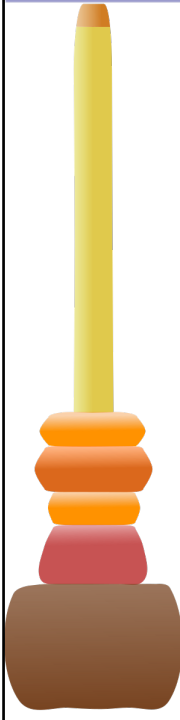
(A) Esquema	(B) Elemento estructural		(C) T3SS1		(D) T3SS2	
	Translocón		SipB, SipC		SseB, SseC, SseD	
	Punta de aguja		SipD		?	
	Aguja		PrgI		?	
	Anillo externo		InvG, InvH?		SsaG*	
	Cuello	Varilla interna	InvG	PrgJ	?	?
	Anillo interno		PrgHK, InvALN, SpaPQRS		SsaV, SsaJRSTU*	
	Anillo C		InvK, SpaO		SsaQ _L **	
	Complejo regulador		InvC (ATPasa), SpaL		SsaN (ATPasa), SsaLM, SpiC	
	Chaperonas		InvB, SicA, SigE, SicP		SrcA, ScsB, SsaE, SsaQ _s **	
	Sin asignar		SsaHIKOP			

Figura I.7: Estructura y composición de los T3SSs de *Salmonella*. (A) Representación esquemática de la estructura de los T3SSs. (B) Elementos estructurales de los T3SSs. (C) y (D) Proteínas involucradas en la composición de los T3SS1 y T3SS2, respectivamente. *Estimaciones debidas a similitudes con otros T3SSs. **La traducción en tándem de SsaQLS(long, short) produce la expresión de dos proteínas, donde SsaQS actúa como una chaperona para el componente estructural SsaQL ([Yu et al., 2011](#)).

Regulación de los T3SS

Se requiere una rápida y precisa regulación de la actividad de los T3SSs para la adaptación a las diferentes condiciones ambientales a las que es sometida *Salmonella* durante el proceso de infección. Esta regulación sucede a niveles diferentes, desde la transcripción y la traducción hasta las interacciones proteína-proteína y la secreción. En estas redes reguladoras influye una amplia gama de factores externos e internos (Fass & Groisman, 2009; Golubeva et al., 2012). Los genes de la SPI1 se expresan principalmente durante las etapas iniciales de la infección, en el intestino. Una vez dentro de las células epiteliales aumenta la expresión de la SPI2 y, finalmente, la SPI2 muestra una expresión predominante una vez que la bacteria ha atravesado el epitelio y reside en las vacuolas de los macrófagos (Hautefort et al., 2008). A pesar de este patrón aparentemente recíproco de la expresión a lo largo de la invasión, ambas islas están correguladas por las mismas proteínas reguladoras globales. Ambas islas son fuertemente reprimidas por la proteína H-NS (Lucchini et al., 2006; Oshima et al., 2006) y activadas por IHF, FIS y OmpR (Ellermeier & Slauch, 2007; Feng et al., 2003; Kelly et al., 2004; Mangan et al., 2006; Osborne & Coombes, 2011). Además, existe una relación entre ambas islas dada por la inducción de la expresión de *hilA* (SPI1) y de *ssrAB* (SPI2) por HilD, el cual mitiga la acción represora de H-NS (Bustamante et al., 2008). En la **Figura I.8** se esquematizan las vías de regulación de los dos sistemas de secreción de *Salmonella*.

Regulación del T3SS1

La activación del T3SS1 de *Salmonella* se produce en el lumen intestinal promovido por diversos factores ambientales como la osmolaridad, la tensión de oxígeno, el pH (Altier, 2005), ácidos grasos de cadena corta (acetato, formiato, propionato y butirato) (Golubeva et al., 2012) y de cadena larga (Golubeva et al., 2015). De esta forma es probable que la bacteria comience a secretar efectores al entorno intestinal tras la colonización. Hay estudios que avalan esta idea al mostrar que, aproximadamente, el 80-90% de los efectores secretados por el T3SS1 de *Salmonella* se asocian a bacterias no adheridas o están en el medio de infección, mientras que solo el 10% se transloca al interior de la célula hospedadora (Collazo & Galán, 1997).

La expresión de la SPI1 está controlada por cuatro activadores transcripcionales tipo AraC codificados en la propia isla: HilA, HilC, HilD e InvF. HilC e HilD controlan su propia

transcripción y la de su compañero, y juntos activan a *hilA*, a través de complejos mecanismos (Ellermeier *et al.*, 2005; Olekhovich & Kadner, 2002; Schechter & Lee, 2001). Ni HilC ni RtsA, otro activador de la SPI1, pueden activar a *hilA* por sí mismos, pero actúan amplificando la transcripción mediada por HilD (Chubiz *et al.*, 2010; Golubeva *et al.*, 2012). HilA, a su vez, activa a *invF*, los genes que codifican el T3SS1 y sus proteínas efectoras (Bajaj *et al.*, 1995).

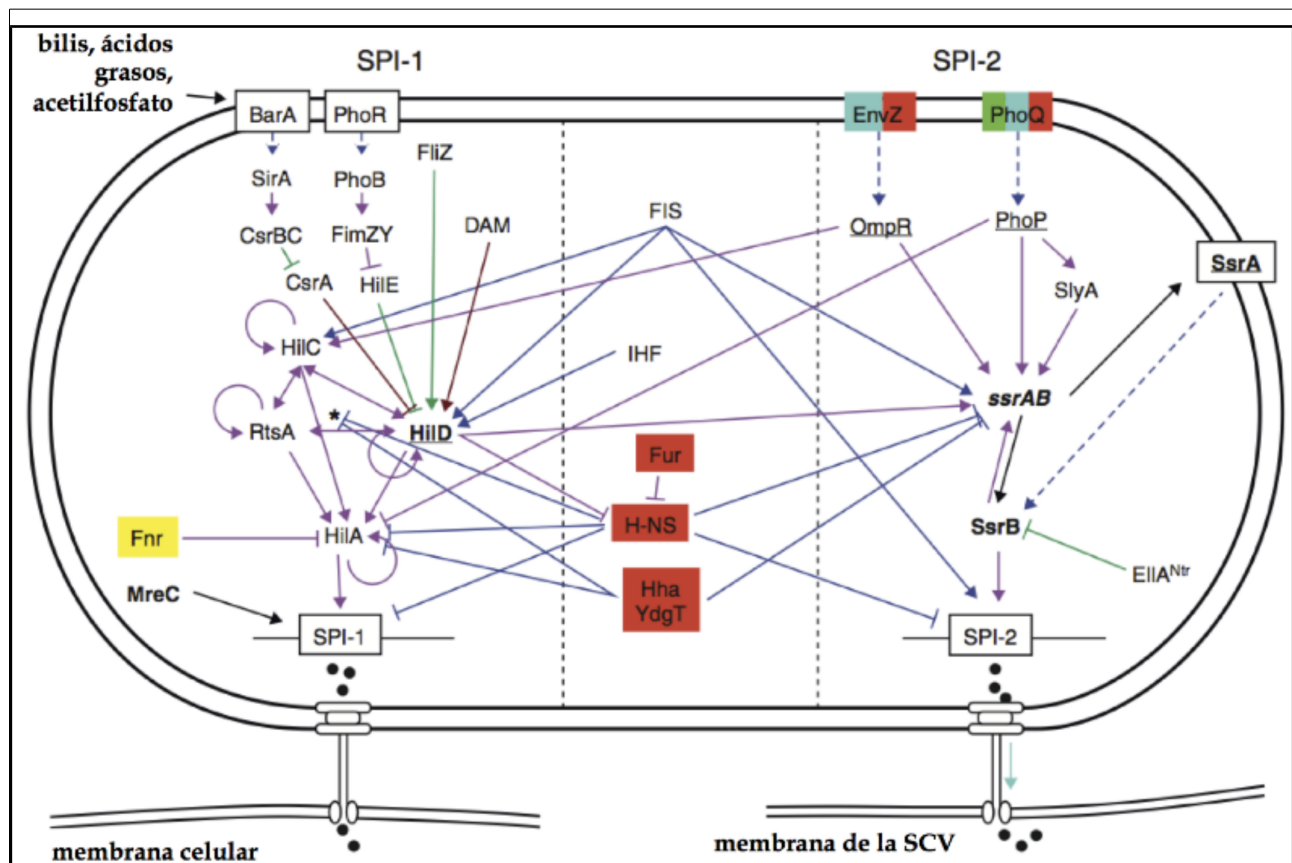


Figura I.8: Regulación de los T3SSs de *Salmonella*. A la izquierda se representa la regulación de la SPI1; en el centro se muestran los elementos con impacto en ambas islas de patogenicidad; a la derecha se representa la regulación de la SPI2. Los reguladores clave están en negrita y los participantes principales de la regulación cruzada, subrayados. La naturaleza del impacto sobre la regulación se indica con un código de colores. Así, los factores ambientales se muestran en rojo (osmolaridad), azul celeste (pH), amarillo (oxígeno) y verde claro (péptidos antimicrobianos); la síntesis proteica se muestra en rosa (unión a promotor/transcripción), azul oscuro (estructuración del ADN/transcripción), marrón (regulación postranscripcional del ARN) y naranja (regulación traduccional); las interacciones proteicas se presentan en verde oscuro (unión directa) y azul oscuro intermitente (fosforilación). *Mecanismos de regulación en el triunvirato de HilD, HilC y RtsA. Imagen adaptada de (Moest & Méresse, 2013)

La red que forman estos reguladores incorpora, también, señales procedentes de reguladores globales. Por ejemplo, Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) reduce la expresión de SPI1 mediante la represión de la transcripción de *hilA* e *invF* (Baek *et al.*, 2009). H-NS y Hha, proteínas asociadas al nucleoide (NAPs, de *nucleoid-associated proteins*), se unen a regiones localizadas aguas arriba y abajo del promotor de *hilA* reprimiendo su expresión (Olekhovich & Kadner, 2006; Queiroz *et al.*, 2011). HilC e HilD son sustratos de la proteasa dependiente de ATP Lon (Takaya *et*

al., 2005), la cual contribuye a la represión de la SPI1 tras la invasión de células epiteliales (Boddicker & Jones, 2004). HilE es un regulador negativo de SPI1 (Fahlen *et al.*, 2000) y puede interferir con la función de HilD por interacción directa proteína-proteína (Baxter *et al.*, 2003). La transcripción de *hilE* se activa por el regulador de las fimbrias FimYZ (Baxter & Jones, 2005) y se reprime por el regulador dependiente de PTS (*phosphotransferase system*) Mlc (Lim *et al.*, 2007), y esto se transmite a la SPI1 a través de HilD. Los sistemas de dos componentes PhoQ/PhoP y PhoR/PhoB pueden activar la expresión de *hilE* (Ellermeier & Slauch, 2007; Jones, 2005) y reprimir la de *hilA* (Golubeva *et al.*, 2012; Lucas *et al.*, 2000). El sistema Csr reprime la expresión de la SPI1 (Altier *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2011) a través de la sobreexpresión de *csrA* y lo activa a través de CsrB y CsrC, antagonistas de CsrA, los cuales son activados a su vez por el sistema de dos componentes BarA/SirA (Fortune *et al.*, 2006). También se activa la SPI1 a través del regulador de la absorción de hierro, Fur (Ellermeier & Slauch, 2008; Teixidó *et al.*, 2011; Troxell *et al.*, 2011). En *S. enterica* serovar Enteritidis se reprime la expresión de *hilA* en condiciones aerobias a través de Fnr (Van Immerseel *et al.*, 2008), el cual activa muchos genes de la SPI1 en *S. enterica* serovar Typhimurium en condiciones anaerobias (Fink *et al.*, 2007). El sistema de dos componentes EnvZ/OmpR activa la SPI1 mediante el control de la expresión de *hilD* a nivel postranscripcional (Ellermeier *et al.*, 2005; Ellermeier & Slauch, 2007). Recientemente se ha descrito que FliZ, un inhibidor de RpoS (Pesavento *et al.*, 2008), activa la expresión de la SPI1 mediante el control de la actividad de HilD (Chubiz *et al.*, 2010). También esta descrita la regulación de la SPI1 por metilación de adenina (Balbontín *et al.*, 2006; García-Del Portillo *et al.*, 1999; López-Garrido & Casadesús, 2010). Esta regulación dependiente de la metilasa Dam es transmitida vía HilD a nivel postranscripcional y ejercida por productos de otro elemento génico adquirido horizontalmente, el grupo fimbrial *std*, que codifica un tipo de apéndice ensamblado por la vía CU (López-Garrido & Casadesús, 2012). El citoesqueleto bacteriano también es importante en la regulación de este sistema, pero no en su ensamblaje y actividad (Bulmer *et al.*, 2012). Recientemente se ha descrito la represión de SPI1 por LeuO. Este regulador transcripcional de tipo LysR actúa mediante dos vías: una vía principal a través de la activación de *hilE*, cuyo producto HilE es un inhibidor de HilD, y una vía secundaria independiente de HilE e HilD (Bustamante & Calva, 2014; Dillon *et al.*, 2012; Espinosa & Casadesús, 2014).

Regulación del T3SS2

La expresión de este sistema depende principalmente de tres sistemas reguladores de dos componentes: SsrA/SsrB, PhoP/PhoQ y EnvZ/OmpR, siendo el regulador central el sistema SsrA/SsrB [revisado en (Fass & Groisman, 2009)].

(i) SsrA es el sensor integral de membrana y SsrB es el regulador de respuestas. El sistema se activa al estar *Salmonella* dentro de macrófagos, e *in vitro* cuando se incuba en medio mínimo a pH ácido (Miao *et al.*, 2002). SsrB se une a los promotores de todos los grupos génicos funcionales de la SPI2 cuando está fosforilada (Walthers *et al.*, 2007), y es esencial para la expresión tanto del T3SS2 como de sus efectores independientemente de que estén estos codificados dentro de la SPI2 o fuera (Worley *et al.*, 2000). Además, SsrB activa su propia transcripción y la de *ssrA* (Feng *et al.*, 2003). Esto está controlado negativamente por EIIA^{Ntr}, el cual se une directamente a SsrB e impide así su unión a los promotores diana (Choi *et al.*, 2010). SsrB activa directamente la transcripción de los sustratos del T3SS2 (SifA, SifB, SseJ, PipB, etc.) y promueve la transcripción del propio T3SS2 desplazando a H-NS de la región promotora de la SPI2 (Walthers *et al.*, 2011). Además, H-NS reprime la expresión de *ssrA* mediante la unión directa a su promotor (Bustamante *et al.*, 2008). Las NAPs YdgT y Hha reprimen la transcripción de los genes de la SPI2 de manera dependiente de SsrB (Coombes *et al.*, 2005; Silphaduang *et al.*, 2007). IHF y FIS son NAPs que, al contrario que las mencionadas antes, son necesarias para la correcta expresión de los genes de la SPI2 (Kelly *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006b; Mangan *et al.*, 2006; Yoon *et al.*, 2003).

(ii) FIS también puede regular la expresión de SPI2 a través del control de la expresión de otros genes como *phoP*. PhoP es un importante regulador de la SPI2 (Bijlsma & Groisman, 2005b; Deiwick *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Worley *et al.*, 2000), aunque dispensable (Miao *et al.*, 2002). El sistema PhoQ/PhoP es un regulador ancestral conservado en *Salmonella* y otras especies relacionadas, se requiere para la virulencia y la supervivencia de *Salmonella* dentro de macrófagos (Groisman, 2001; Miller *et al.*, 1989). PhoP se une directamente al promotor de *ssrB* y controla SsrA a un nivel postranscripcional (Bijlsma & Groisman, 2005b). PhoP también regula la expresión y/o activación de la proteína SlyA (Cano *et al.*, 2001; Navarre *et al.*, 2005), la cual se une al promotor de *ssrA*, regulando la expresión de los genes de la SPI2. El papel de SlyA parece estar limitado a impedir el silenciamiento por H-NS (Perez *et al.*, 2008). El regulador de la SPI1 HilD

también favorece la expresión del sistema SsrA/SsrB desplazando a H-NS de una región corriente abajo del promotor de *ssrAB* (Martínez *et al.*, 2014).

(iii) EnvZ/OmpR desempeña un papel importante en la expresión de la SPI2. OmpR actúa como regulador de respuesta y se une a los promotores de *ssrA* (Lee *et al.*, 2000) y de *ssrB* (Feng *et al.*, 2003) promoviendo su transcripción. Pese a que el sitio de unión de OmpR al promotor de *ssrA* solapa con el de SsrB, no parece que OmpR antagonice el silenciamiento promovido por H-NS (Bustamante *et al.*, 2008).

(iv) El T3SS2 también está regulado a nivel de secreción por un sensor de pH desconocido que reacciona al pH neutro del citoplasma eucariótico. El T3SS2 se ensambla en condiciones de bajo pH en el ambiente vacuolar y secreta las proteínas del translocón y cantidades insignificantes de efectores. La formación del translocón permite la detección del pH neutro del citoplasma eucariota, y esto causa la disociación y degradación del complejo regulador SsaL-SsaM-SpiC, permitiendo la secreción de aproximadamente 25 efectores, los cuales se translocan a través de la membrana vacuolar (Yu *et al.*, 2010).

Efectores de los T3SS de *Salmonella* y procesos en los que intervienen

Los sustratos de los T3SSs pueden estar codificados tanto dentro de las SPI1 y SPI2 como fuera de ellas, normalmente dentro de fragmentos génicos con características de adquisición horizontal. El contacto de la bacteria con la superficie de la célula hospedadora activa la translocación de efectores mediada por el T3SS1 (Galán, 2001; Hayward *et al.*, 2005). Algunos de estos efectores están involucrados en la inducción de pliegues locales de membrana y en la invasión bacteriana (Galán, 1996). Los efectores del T3SS1 también están implicados en la producción de citoquinas proinflamatorias, en la activación de las vías MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), en el reclutamiento de linfocitos PMNs y en la inducción de inflamación intestinal aguda. El T3SS2 se expresa intracelularmente en respuesta al pH ácido y la limitación de nutrientes encontrados en el lumen de la SCV. Transloca efectores desde la vacuola que se requieren para la modulación del ambiente intracelular (Malik-Kale *et al.*, 2011). Pese a las diferencias entre ambos sistemas existen efectores de uno y otro que se necesitan al mismo tiempo (Brawn *et al.*, 2007; Lawley *et al.*, 2006). En la **Figura I.9** se enumeran la mayoría de los efectores conocidos hasta el momento.

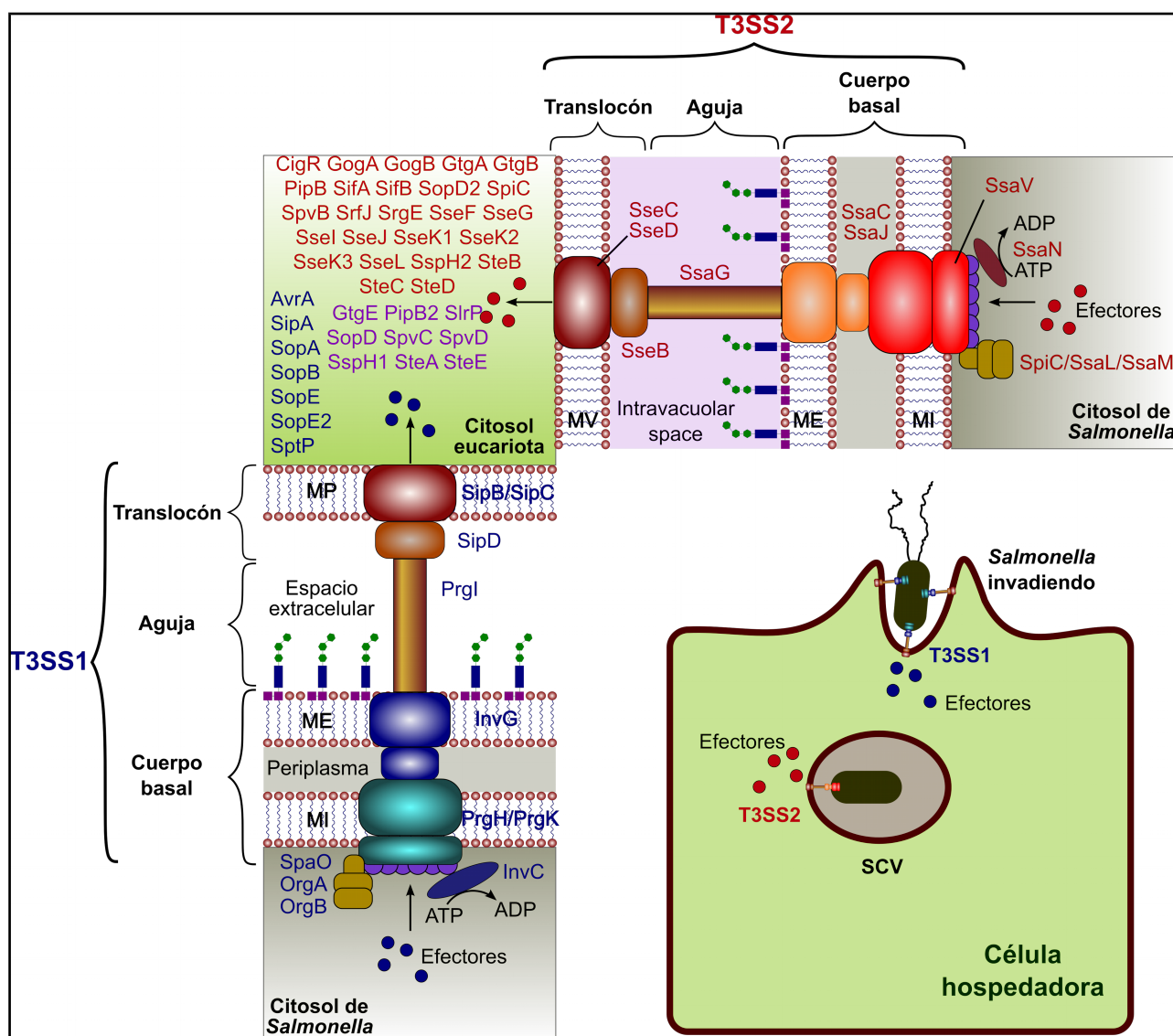


Figura I.9: Representación esquemática de los T3SS1 y T3SS2 de *Salmonella*. MV: membrana vacuolar. Los componentes del T3SS1 y sus efectores aparecen en azul; los componentes del T3SS2 y sus efectores aparecen en rojo. Los efectores translocados a través de ambos sistemas aparecen en púrpura. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012)

La idea, tratada previamente, de que muchos efectores de *S. enterica* se secretan al entorno intestinal (Collazo & Galán, 1997) hace pensar que los efectores de *Salmonella* podrían interactuar funcionalmente con el hospedador a nivel intra- y extracelular. Un ejemplo de ello es el efector SipA que promueve gastroenteritis mediante dos motivos funcionales que desencadenan, de manera individual, mecanismos de entrada bacteriana o de inflamación (Wall *et al.*, 2007). SipA sufre un procesamiento, a través de la caspasa-3 del hospedador, en la superficie del epitelio intestinal, esto sugiere que SipA necesita ser cortado antes de la interacción con la superficie apical de la célula hospedadora (Srikanth *et al.*, 2010).

Endocitosis mediada por *Salmonella*

S. enterica es capaz de inducir su propia entrada en células no fagocíticas, gracias al concurso de un conjunto de 7 efectores del T3SS1 (SipA, SipB, SipC, SopB, SopD, SopE y SopE2). Mediante la deformación de la membrana de la célula hospedadora y la reorganización del citoesqueleto de actina, la bacteria provoca su internalización en la SVC (Galán, 2001).

(i) SipA no es imprescindible para la entrada, pero sí aumenta la eficacia de la invasión, al promover la polimerización de actina y potenciar la actividad nucleadora de actina de SipC [revisado en (Haraga & Miller, 2006)]. SipA induce la actividad, en la célula hospedadora, de la T-plastina (fimbrina), modulando de este modo el empaquetamiento de actina (Zhou *et al.*, 1999); e inhibe a las proteínas despolimerizadoras de actina ADF/cofilina y gelsolina (McGhie *et al.*, 2004).

(ii) SipB, una proteína del translocón, se une directamente al colesterol de la membrana plasmática eucariótica y media el acoplamiento de *Salmonella* a las células diana. Es más, la eliminación del colesterol presente en la membrana plasmática limita la secreción a partir de los T3SSs de *S. enterica* serovar Typhimurium, lo que da lugar a un descenso en la invasión de la célula hospedadora (Hayward *et al.*, 2005). Además, coopera con SipA para promover la polimerización de filamentos de actina en el lugar de adhesión bacteriana, y evitar el desensamblaje de los filamentos por factores del hospedador (McGhie *et al.*, 2001).

(iii) SipC interacciona con el componente del complejo exocisto Exo70, el cual media la conexión y fusión de vesículas exocíticas con la membrana plasmática (Nichols & Casanova, 2010). Además, posee dos dominios definidos con distintas funciones catalíticas, el dominio carboxilo terminal polimeriza monómeros de actina, dando lugar a un rápido crecimiento del filamento; y el dominio amino terminal une los filamentos, formando haces (Hayward & Koronakis, 2002). Recientemente se ha descrito la participación de SipC en la redistribución a la superficie de la membrana apical de PERP, una proteína del hospedador clave para la respuesta inflamatoria inducida por *Salmonella* (Hallstrom & McCormick, 2016).

(iv) SopB (también conocido como SigD) está implicado en la invasión a través de sus actividades fosfatidilinositol 4-fosfatasa y 5-fosfatasa. Ambas actividades son necesarias para el reclutamiento de SNX9 (*sorting nexin 9*) y la formación de pliegues de membrana mediados por SNX9 (Piscatelli *et al.*, 2016), así como para el reclutamiento del complejo AnxA2 (anexina

A2)/p11 en el sitio de invasión para mejorar la eficiencia de la invasión (Jolly *et al.*, 2014). Recluta a VAMP8, una v-SNARE que media la fusión homotípica de endosomas tempranos y tardíos y regula la exocitosis, lo cual contribuye al proceso de entrada de *Salmonella* (Dai *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 1998).

(v) SopD, que se transloca a través de los dos T3SSs de *S. enterica*, actúa en cooperación con SopB e interviene en la fusión de membranas y formación del macropinosoma durante la infección (Bakowski *et al.*, 2007). La diana intracelular de SopD es la proteína G pequeña Cdc42 (Rogers *et al.*, 2008). Induce, junto con SopB, la secreción de fluidos e inflamación (Jones *et al.*, 1998).

(vi) SopE y SopE2, pese a no tener secuencias similares a los factores de recambio de guaninas (GEFs) eucarióticos, imitan a estos factores y poseen un mecanismo de acción muy parecido (Buchwald *et al.*, 2002; Schlumberger *et al.*, 2003). Mediante este mecanismo SopE y SopE2 activan las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000). SopE puede activar tanto a Cdc42 como a Rac1 mientras que SopE2 solo activa a Cdc42 (Friebe *et al.*, 2001). La activación de Rac1 por SopE, pero no la de Cdc2, se requiere para provocar la internalización de la bacteria (Patel & Galán, 2006) a través del reclutamiento del complejo regulador WAVE y la cooperación de un factor de cambio de nucleótidos de guanina del hospedador llamado ARNO (Humphreys *et al.*, 2012). Además SopE también activa a RalA, una GTPasa requerida para el ensamblaje del exocisto (Nichols & Casanova, 2010).

Algunos de los efectores mencionados anteriormente inducen la remodelación del citoesqueleto de actina durante la entrada de *Salmonella* en la célula eucariótica. Lo pueden hacer por dos vías distintas, o bien uniéndose directamente a la actina (SipA y SipB) o bien mediante la activación de GTPasas Rho celulares que se requieren para la formación de redes de actina altamente ramificadas (SopB, SopE y SopE2).

(i) SipA y SipB se unen directamente a la actina, cooperan para promover la polimerización de filamentos de actina en el lugar de adhesión bacteriana, y evitan el desensamblaje de los filamentos por factores del hospedador (McGhie *et al.*, 2001). SipA induce la actividad, en la célula hospedadora, de la T-plastina (fimbrina), modulando de este modo el empaquetamiento de actina (Zhou *et al.*, 1999); e inhibe a las proteínas despolimerizadoras de actina ADF/cofilina y gelsolina (McGhie *et al.*, 2004). SipC, por su parte, posee distintos dominios capaces de nuclear la actina y promover el empaquetamiento de la misma (Chang *et al.*, 2005; Myeni & Zhou, 2010).

(ii) SopB, SopE y y SopE2 modulan la formación de los filamentos de actina a través de GTPasas Rho celulares. SopE y SopE2 activan las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Hardt *et al.*, 1998; Stender *et al.*, 2000) y SopB activa indirectamente a RhoG mediante la activación de una GEF (Patel & Galán, 2006).

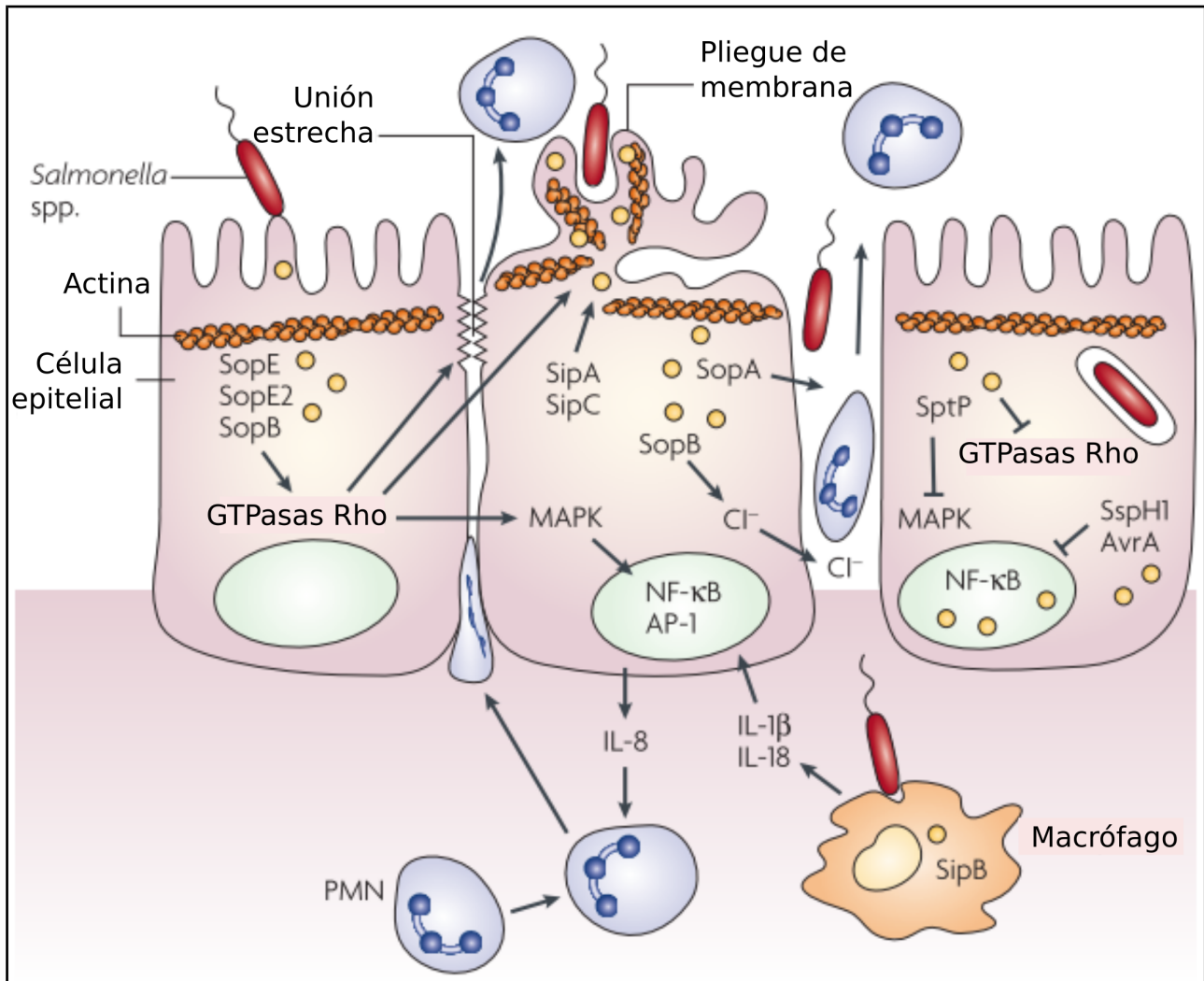


Figura I.10: Cambios inducidos por el T3SS1 en las células hospedadoras. *Salmonella* dirige su propia internalización en las células hospedadoras mediante un mecanismo caracterizado por la aparición de grandes pliegues de membrana en el lugar de entrada de la bacteria. Los efectores (esferas amarillas) del T3SS1 SipA, SipC, SopB, SopE y SopE2 inducen este proceso, el cual es revertido por la acción del efector SptP. A su vez, SipA, SopB, SopE y SopE2 contribuyen a la interrupción de las uniones estrechas. Por el contrario, AvrA las estabiliza. Imagen adaptada de (Haraga *et al.*, 2008).

Al final del proceso de invasión interviene SptP. Este efector posee actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) antagonista a SopE y SopE2, inactivando a Rac1 y Cdc42 después de la invasión y revirtiendo los cambios producidos en el citoesqueleto de actina y en la membrana plasmática dentro de las primeras 3 h de infección (Fu & Galán, 1999; Galan & Zhou, 2000). SptP,

contribuye también a la evasión de la inmunidad innata del hospedador mediando la supresión de la desgranulación de mastocitos locales (Choi *et al.*, 2013).

Alteración de las uniones estrechas

Las células epiteliales se unen entre sí por uniones estrechas, estas uniones están especializadas y funcionan como barreras para la difusión de algunas proteínas de membrana y de lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana plasmática. Además, sirven como selladoras para mantener las células juntas y, así, impedir el paso de, incluso, pequeñas moléculas. Están compuestas por las proteínas transmembrana claudinas y ocludinas; las proteínas periféricas intracelulares de membrana, proteínas ZO; y algunas proteínas asociadas. *Salmonella* modifica las uniones estrechas (**Figura I.10**) a través de la acción de cuatro efectores del T3SS1: SipA, SopB, SopE y SopE2 (Boyle *et al.*, 2006). Con ello, la bacteria aumenta la permeabilidad de la barrera epitelial. La desestabilización de estas uniones intercelulares permite la transmigración de PMNs desde la superficie basolateral a la apical, la fuga de fluido celular y el acceso de las bacterias a la superficie basolateral. Esta transmigración, sin embargo, puede ocurrir también sin necesidad de alterar las uniones estrechas, y esto lo consigue SopA, que actúa como una ligasa de ubiquitina HECT3 (Zhang *et al.*, 2006) y posee un sitio de corte por caspasa-3, necesario para su activación. El efector AvrA, también sustrato del T3SS1, actúa, sorprendentemente, como un estabilizador de las uniones estrechas (Liao *et al.*, 2008) bloqueando la vía de la Jun quinasa (JNK) (Zhang *et al.*, 2015b).

Respuestas nucleares

Los efectores tipo III contribuyen a los cambios transcripcionales observados en las células infectadas por *Salmonella*. Al infectar células humanas con el mutante *invA*, que no posee el T3SS1 funcional, o con el mutante *avrA slrP sopA sopB sopD sopE sopE2 sptP sspH1*, carente de efectores implicados en la invasión y otros procesos celulares, se obtienen perfiles transcripcionales similares a los de células sin infectar, lo que demuestra que la reprogramación llevada a cabo por la bacteria silvestre depende de uno o más efectores del T3SS1 (Bruno *et al.*, 2009). SopB, SopE y SopE2 activan GTPasas que estimulan la respuesta inmune innata al inducir las vías ERK, JNK y p38 (MAPK) que, a su vez, inducen los reguladores principales AP-1 y NF- κ B (Bruno *et al.*, 2009;

Hobbie *et al.*, 1997; Patel & Galán, 2006). Estos establecen la secreción basolateral de interleuquina (IL) IL-8, que es un requerimiento para la migración de PMNs (McCormick *et al.*, 1993), provocando la inflamación. Por otro lado, un mutante *sipA sopA sopB sopD sopE sopE2* muestra un patrón diferente de respuesta celular relacionado con la regulación del citoesqueleto de actina y las vías del fosfatidilinositol, CCR3, Wnt y TGFB, cuando se compara con una estirpe silvestre en la infección de placas de Peyer bovinas (Lawhon *et al.*, 2011).

Además, SspH1 inhibe la expresión génica dependiente de NF- κ B; y, junto con SptP, participa en la inhibición de la liberación de IL-8. Adicionalmente, GogB, SseL y AvrA presentan actividad desubiquitinasa, bloqueando la degradación de I κ B α e inhibiendo la vía NF- κ B (Collier-Hyams *et al.*, 2002; Le Negrate *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2007). AvrA está asociado con el interferón γ (Liu *et al.*, 2010); y, además, también bloquea la vía NF- κ B mediante la ubiquitinación de β -catenina (Ye *et al.*, 2007). También inhibe la activación de la vía JNK inducida por *Salmonella* (Du & Galán, 2009) e induce la acetilación de p53 (Wu *et al.*, 2010). Así mismo, AvrA restaura las uniones estrechas del epitelio con el fin de apagar las vías inflamatorias (Liao *et al.*, 2008), que es un paso crítico para la supervivencia intracelular y la patogénesis de *Salmonella* (Haraga & Miller, 2003).

Por otro lado, estudios realizados sobre macrófagos de pollo infectados con *S. enterica* serovar Enteritidis han desvelado que SipA, efector del T3SS1, y PipB, efector del T3SS2, suprimen la respuesta innata del hospedador mediante la alteración de los niveles de ciertas quimioquinas y RhoA (Zhang *et al.*, 2008).

Recientemente, en el grupo en que se ha realizado esta tesis, se ha llevado a cabo un análisis transcriptómico en células HeLa transfectadas establemente con el gen del efector SteA. La expresión de SteA en estas células epiteliales dio lugar a inducción de genes relacionados con la matriz extracelular, la regulación de la proliferación celular y la de vías de señalización mediadas por quinasas de serina y treonina. SteA también provocó la represión de genes relacionados con procesos inmunes y con la regulación de la síntesis de purinas (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2014).

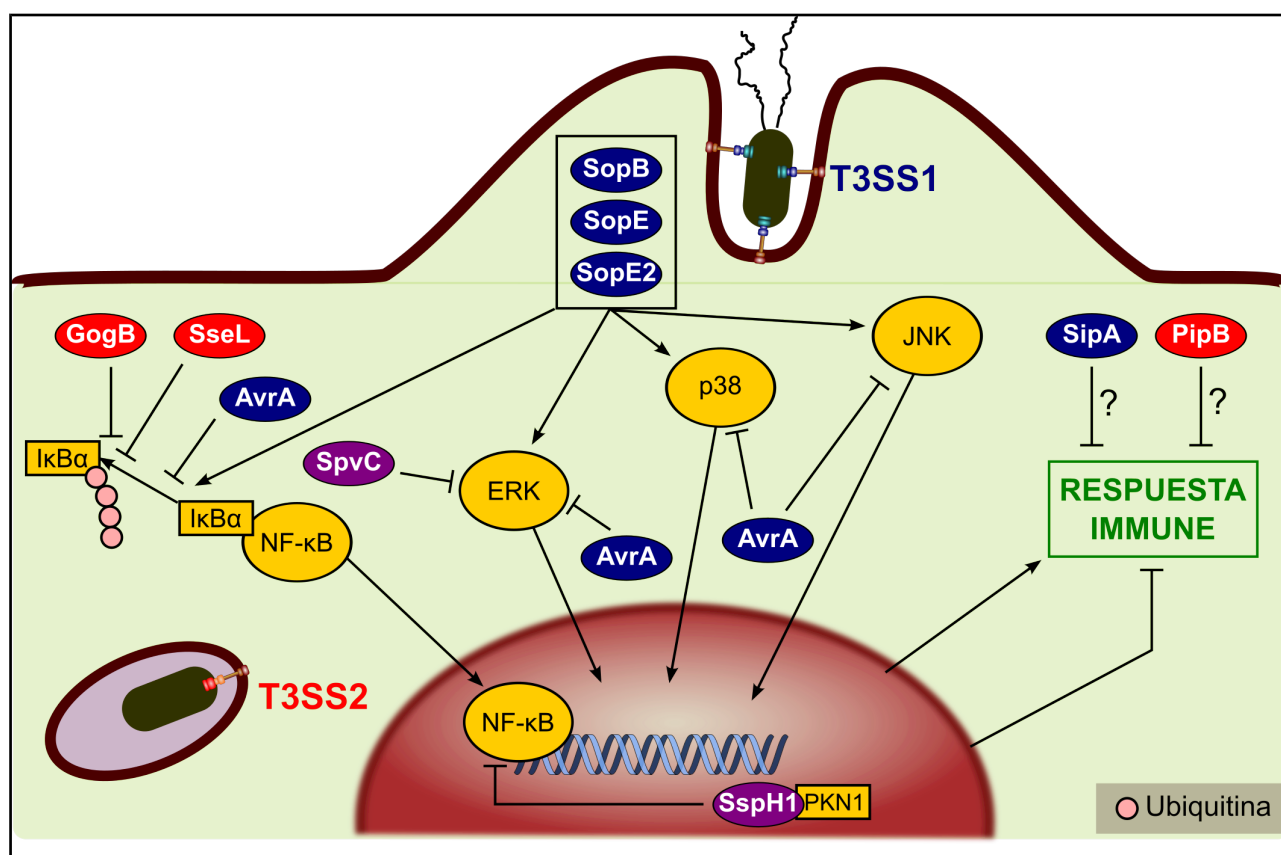


Figura I.11: Respuestas nucleares inducidas por efectores de *Salmonella*. Se representan algunos de los efectos de los efectores *Salmonella* T3SS en las vías de transducción de señal de acogida, lo que lleva a la inducción o inhibición de las respuestas inmunes del huésped, imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012).

Biogénesis de la SCV y proliferación intracelular de *Salmonella*

Una vez internalizada, *Salmonella* establece su nicho en un fagosoma modificado, la SCV, que puede persistir desde unas horas a días (revisado en (Bakowski *et al.*, 2008)). La biogénesis y la maduración de la SCV están característicamente acompañados por la formación de diferentes tipos de túbulos originados y conectados a la SCV (Schroeder *et al.*, 2011). La SCV se mueve desde la membrana plasmática hasta una posición perinuclear (Ramsden *et al.*, 2007), recluta varios miembros de la familia de pequeñas GTPasas Rab (Smith *et al.*, 2007) e interacciona con las vías endo- y exocíticas.

El efector SopB, pese a translocarse por el T3SS1, persiste al menos 12 horas tras la infección y contribuye tanto al mantenimiento de la SCV como a la infección sistémica a tiempo largo en

ratones (Giacomodonato *et al.*, 2007; Lawley *et al.*, 2006). Es ubiquitinado por TRAF6 dentro de la célula hospedadora, lo cual le permite realizar su actividad biológica (Ruan *et al.*, 2014). Manipula de forma directa, a través de su actividad fosfatasa, e indirecta el contenido de fosfatos de inositol de la membrana (Steele-Mortimer *et al.*, 2000; Terebiznik *et al.*, 2002). Esto provoca la exclusión de Rab de la SCV y puede servir para retrasar su fusión con el lisosoma (Bakowski *et al.*, 2008). Además, SopB recluta la GTPasa Rab5 a la membrana de la SCV (Mallo *et al.*, 2008), lo que reclutará reguladores importantes para el tráfico de membrana (Braun *et al.*, 2010; Bujny *et al.*, 2008). SopB también recluta para la SCV a Rab7 y LAMP1 (Braun *et al.*, 2010).

En las infecciones de *S. enterica* serovar Typhimurium la SVC acumula colesterol a lo largo de la infección (**Figura I.12**), hecho que está ligado a la replicación intracelular de la bacteria y parece ser dependiente de SPI2 (Catron *et al.*, 2002). También es importante para la supervivencia intracelular de *Salmonella* la esterificación del colesterol a través de SseJ a nivel de la SCV (Nawabi *et al.*, 2008).

La SCV alcanza una posición yuxtannuclear adyacente al centro organizador de microtúbulos, en las proximidades del aparato del Golgi. Para ello se desplaza a lo largo de los microtúbulos con un movimiento dependiente de dineína (Ramsden *et al.*, 2007). Esta localización es importante para preservar la replicación de *Salmonella* dentro de la SCV, ya que desde allí la SCV adquiere nutrientes y componentes de membrana (Salcedo & Holden, 2003). Este proceso requiere efectores de ambos T3SS: SipA y SopB del T3SS1 y SifA, SseF y SseG del T3SS2 (Boucrot *et al.*, 2005; Deiwick *et al.*, 2006). Una proteína motora asociada a actina, miosina II no muscular, parece contribuir al posicionamiento de la SCV en un proceso en el que está involucrada la actividad fosfatasa de SopB (Wasylnka *et al.*, 2008). En células epiteliales algunas SCVs migran hacia la periferia de la célula hospedadora, en un movimiento centrífugo dependiente de microtúbulos, kinesina y el efector del T3SS2 PipB2 (Knodler & Steele-mortimer, 2005), que está asociado con un descenso en los efectores del T3SS1 SipA y SopB. Este desplazamiento, sumado a la capacidad de la bacteria para escapar de la vacuola, se ha asociado a la habilidad de la bacteria de moverse de una célula a otra con el fin de repetir el ciclo de infección (Knodler *et al.*, 2010; Szeto *et al.*, 2009).

Tras varias horas de la entrada de *Salmonella* se pueden observar filamentos de F-actina alrededor de la SCV, lo que es importante para la replicación bacteriana (Henry *et al.*, 2006). SseI y SspH2 colocalizan con el citoesqueleto de actina interactuando con una proteína de unión a actina del hospedador, la filamina (Miao *et al.*, 2003). La toxina secretada por el T3SS2 SpvB induce

despolimerización de la actina asociada a la vacuola (Browne *et al.*, 2002; Lesnick *et al.*, 2001), lo cual tiene un efecto negativo en la formación de los Sifs.

Durante la maduración de la SCV se produce la formación de tres estructuras de membrana: los Sifs (*Salmonella-induced filaments*), SISTs (*Salmonella-induced secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3) tubules*) y LNTs (*LAMP-1 negative tubules*), estos últimos observados más fácilmente en células epiteliales.

(i) Sifs: Son largas estructuras de membrana extendidas desde la SCV y necesarias para el correcto posicionamiento de dicha vacuola cerca de la región perinuclear del hospedador, en la proximidad del aparato de Golgi. Aparecen con el inicio de la replicación bacteriana, horas después de la invasión. Derivan de los compartimentos endocíticos tardíos, presentan la misma composición que las membranas de la SCV y contienen colesterol, ATPasa vacuolas, LAMPS, Rab7, ácido lisobifosfatídico y catepsina D (Drecktrah *et al.*, 2008; Rajashekar *et al.*, 2008; Steele-Mortimer, 2008). Los Sifs también son positivos para SCAMP3 y ello indica que pueden incorporar membrana de la vía secretora (Mota *et al.*, 2009). En la formación de los Sifs están involucrados los efectores PipB2, SifA, SopD2, SseF, SseG y SseJ, mientras que SpvB parece tener un efecto negativo en su formación. SifA activa la GTPasa RhoA y se une a la proteína eucariota SKIP (*SifA and kinesin-interacting protein*), regulando el nivel de la proteína motora de microtúbulos kinesina-1 en la SCV (Boucrot *et al.*, 2005). PipB2 también recluta kinesina-1 (Henry *et al.*, 2006), que junto al complejo SifA-SKIP, promueve la elongación de los túbulos a lo largo de los microtúbulos. La formación de los Sifs requiere una red de microtúbulos intacta (Brumell *et al.*, 2002; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993). Parece que SseJ colabora con SifA en la formación de los Sifs (Ohlson *et al.*, 2008), mediante la interacción con SKIP y RhoA (Schroeder *et al.*, 2011). A consecuencia de esto, la composición de lípidos de la SVC varía y promueve la formación de túbulos. SopD2 se asocia a los endosomas tardíos y puede contribuir a la formación de Sifs dirigiendo las vesículas endocíticas a la SCV y a los túbulos nacientes (Schroeder *et al.*, 2010). SseF y SseG median el empaquetamiento de microtúbulos cerca de la SCV, lo que puede promover la fusión de vesículas agregadas en túbulos (Deiwick *et al.*, 2006; Schroeder *et al.*, 2010). Se ha observado también la relación molecular entre SifA y SipA a nivel de dichos filamentos (Brawn *et al.*, 2007). Los Sifs desempeñan un papel importante en la patogénesis bacteriana (Stein *et al.*, 1996), por lo que se cree que su función es la intercepción de nutrientes y membrana desde el tráfico celular del hospedador (Mota *et al.*,

[2009](#)) para aumentar el tamaño de la SCV y acomodar la replicación bacteriana durante la infección sistémica.

(ii) SISTs: Contienen SCAMP3 y efectores del T3SS2 pero no poseen ni LAMP1 ni otros marcadores endocíticos tardíos ([Mota *et al.*, 2009](#)). Para la formación de los SISTs se requiere los efectores PipB2, SifA, SopD2, SseF y SseG.

(iii) LNTs: Carecen de LAMP1 y SCAMP3 pero están enriquecidos en efectores del T3SS2. Se forman, también, a lo largo de los microtúbulos de manera dependiente de la kinesina-1, pero carecen de los marcadores de Sifs y SISTs a excepción de la ATPasa vacuolar. Se ha sugerido que, en su formación, SopD2 y SifA ejercen papeles negativo y positivo, respectivamente, así como que PipB2 interviene en su extensión centrífuga ([Schroeder *et al.*, 2010](#)).

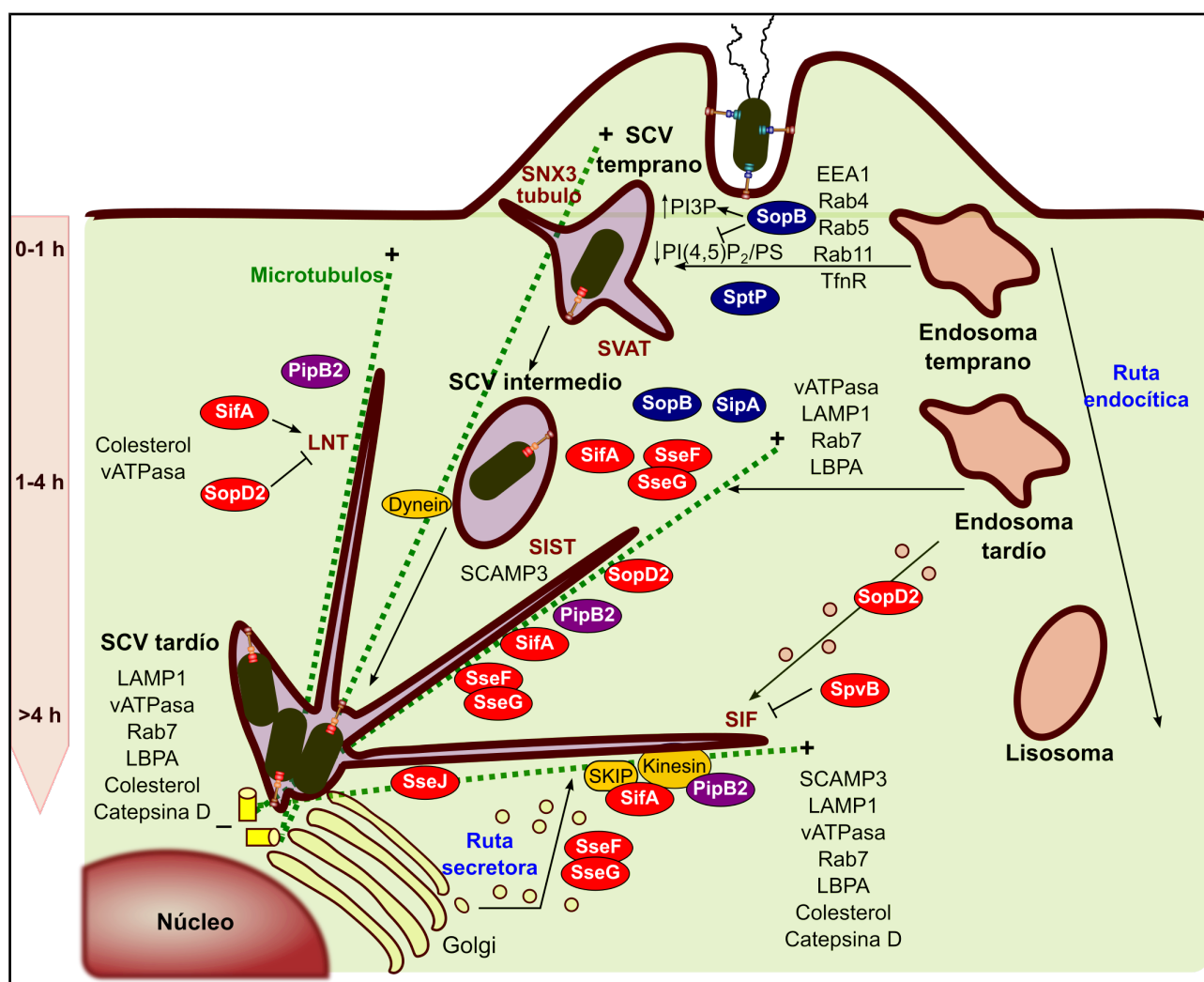


Figura I.12: Biogénesis de la vacuola que contiene *Salmonella*. Después de la internalización, *Salmonella* establece un nicho intracelular dentro de un fagosoma modificado conocido como vacuola que contiene *Salmonella* (SCV). El paso inicial en la biogénesis (0-1 h) el SCV se rige por los efectores del T3SS1 SopB y SptP (en azul) y se caracteriza por la formación de tubulos SVATs y SNX3. El movimiento del SCV a una posición juxtancuclear durante la etapa intermedia de desarrollo (1-4 h) requiere de la participación de los efectores SipA y SopB, T3SS1, y los efectores SifA, SseF y SseG, T3SS2 (en rojo). Muchos efectores están involucrados en la etapa final de maduración y en el mantenimiento de la SCV. La replicación se inicia 4-6 h postinvasión y se acompaña de la formación de diferentes tipos de tubulos conocidos como los Sifs, SISTs, y LNTs. Los efectores implicados en la formación de estos tubulos se representan en rojo (efectores T3SS2) y en púrpura (efectores de ambos sistemas). El proceso de maduración también se caracteriza por la interacción con las rutas endocítica y secretora del hospedador. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012).

Hay que señalar que, aunque el nicho intracelular típico de *S. enterica* serovar Typhimurium sea la SCV, datos recientes indican que en la células epiteliales hay dos subpoblaciones de *Salmonella*, una vacuolar y otra citosólica. La salida de la SCV lleva a una reprogramación transcripcional de las bacterias y a su replicación en el citosol. Finalmente, la célula epitelial muere por piroptosis (ver más abajo) y las bacterias salen al espacio extracelular, lo que proporciona un mecanismo potencial de diseminación (Knodler, 2015).

Muerte celular

Los T3SSs de *Salmonella* están implicados en tres de los mecanismos de muerte celular en las células hospedadoras, aunque también existen mecanismos de muerte celular independientes de los T3SSs (Guiney, 2005). Existen tres mecanismos de inducción de muerte celular dependientes de los T3SSs: apoptosis en células epiteliales, piroptosis rápida de macrófagos dependiente del T3SS1, y piroptosis retardada de macrófagos dependiente del T3SS2 (Fink & Cookson, 2007) (Figura I.13).

(i) Apoptosis: Es una forma de muerte celular programada que puede iniciarse por estímulos internos o externos. En su desarrollo están implicadas distintas caspasas, como la caspasa-3, que darán lugar a procesos como la reducción del potencial de membrana mitocondrial, segmentación de la citoqueratina, condensación nuclear, fragmentación del ADN, exposición de fosfatidilserina en la superficie celular y mantenimiento de una membrana plasmática intacta. Se requieren los dos T3SSs de *Salmonella* para producir apoptosis en células epiteliales. SlrP, que puede translocarse mediante los dos T3SS, parece contribuir a la muerte celular epitelial mediante su interacción con Trx-1, a la que ubiquitina, y con la chaperona del retículo endoplasmático ERdj3 (Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2009; Bernal-Bayard *et al.*, 2010). El efector SpvB, del T3SS2, también se requiere para la apoptosis (Paesold *et al.*, 2002). Los efectores AvrA y SopB pueden tener actividad antiapoptótica al reprimir la vía apoptótica de la JNK (Wu *et al.*, 2012) y la activación de Akt, respectivamente (Steele-Mortimer *et al.*, 2000). La acción de estos efectores en la represión de la vía apoptótica podría explicar el retraso en la apoptosis de 12-18 h tras la entrada de *Salmonella* (Kim *et al.*, 1998), permitiendo a la bacteria establecer un nicho intracelular estable y evitar la inmunidad adaptativa (Wu *et al.*, 2012).

(ii) Piroptosis rápida: Esta forma de muerte celular observada en macrófagos es dependiente de caspasa-1 (Brennan & Cookson, 2000; Fink & Cookson, 2005), un mediador central de inmunidad innata que no se activa en la apoptosis. Su activación da lugar a la producción de IL-1 β e IL-18, lisis celular y liberación de contenido intracelular proinflamatorio (Cookson & Brennan, 2001). La piroptosis rápida se detecta en las primeras 1-2 h de infección y se ha observado también en células dendríticas (Monack *et al.*, 2001; van der Velden *et al.*, 2003). SipB interacciona directamente con la caspasa-1 (Hersh *et al.*, 1999), provocando la respuesta inflamatoria. Además, para la activación de la caspasa-1 por parte de la flagelina y de PrgJ se requieren componentes del

inflammasoma del hospedador, una plataforma multiproteínica de señalización (Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006, 2007, 2010; Ren *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007).

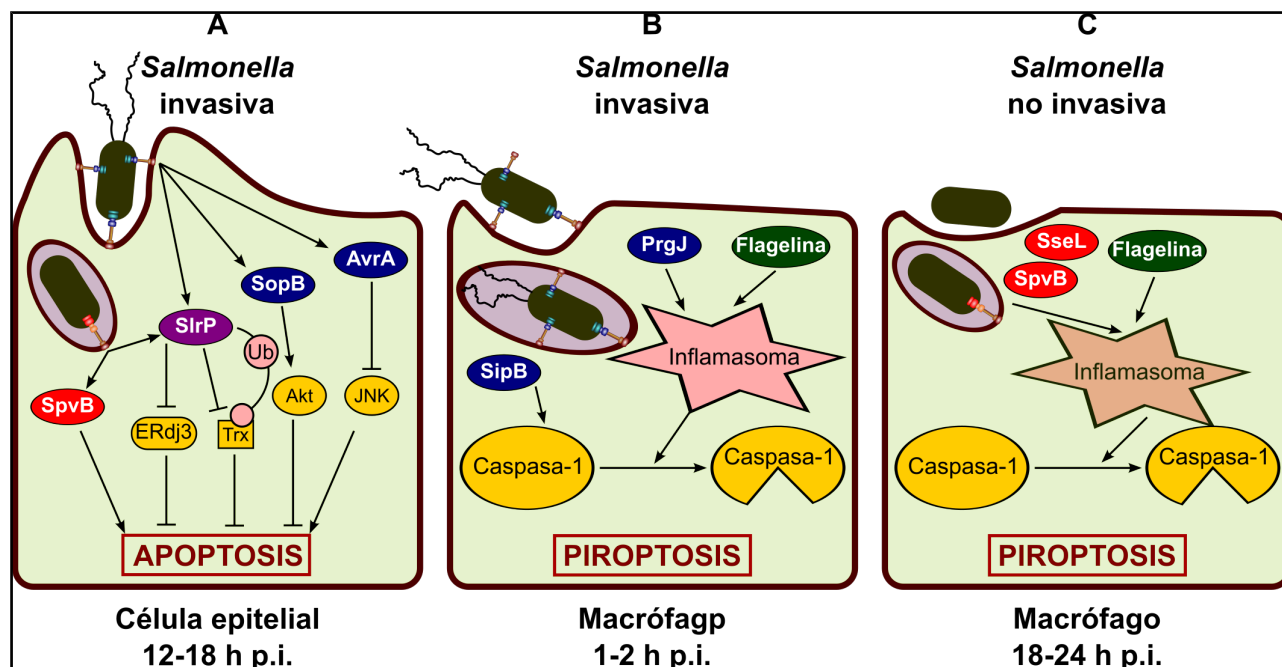


Figura I.13: Muerte de la célula huésped inducida por *Salmonella*. (A) *Salmonella* induce la apoptosis en las células epiteliales de 12 a 18 h después de la infección (p.i.). Se ha sugerido que los efectores AvrA y SopB (secretada a través T3SS1), SpvB (secretada a través T3SS2), y SlrP (secretada a través T3SS1 y T3SS2) participan en este proceso a través de diferentes mecanismos. Ub: ubiquitina. (B) *Salmonella* que expresa el T3SS1 induce piroptosis rápida en los macrófagos. La Piroptosis es una forma proinflamatoria de la muerte celular programada que depende de la activación de caspasa-1. El efector T3SS1 SopB, la proteína varilla T3SS1 PrgJ, y flagelina secretada a través de T3SS1 están involucrados en la inducción de la rápida piroptosis. (C) *Salmonella* no invasiva induce piroptosis retardada en los macrófagos infectados. Los efectores del T3SS2, SpvB y SseL, y la flagelina están involucrados en esta forma de muerte celular. Imagen adaptada de (Ramos-Morales, 2012)

(iii) Piroptosis retardada: Durante la infección bacteriana sistémica la expresión del T3SS1 y de la flagelina están reprimidas, no activándose la caspasa-1 en los macrófagos en fases iniciales de la infección (Schlumberger & Hardt, 2006; Stewart *et al.*, 2011). Al infectar macrófagos en condiciones no invasivas, no se produce la muerte rápida sino que estos empiezan a morir tras 18-24 h de infección. Este tipo de muerte celular requiere del T3SS2, los efectores SpvB y SseL y la flagelina, está activada por caspasa-1, y tiene como resultado la rotura de ADN, lisis celular, producción de IL-1 β e inflamación (Libby *et al.*, 2000; Monack *et al.*, 2001; Rytönen *et al.*, 2007; van der Velden *et al.*, 2003). Además de esta forma de muerte piroptótica algunos autores han observado una muerte retardada de macrófagos similar al proceso de apoptosis en células epiteliales (Guiney & Fierer, 2011).

Tabla I.1: Lista de los efectores conocidos de los sistemas de secreción tipo III de *Salmonella*. *KLC, kinesin light chain.
Adaptado de (Ramos-Morales, 2012) y ampliado de (Habyarimana *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2015)

Efeotor	Localización	T3SS	Actividad	Dianas celulares	Via o proceso celular
AvrA	SPI1	1	Acetiltransferasa Deubiquitinasa	B-catenina, ERK2, I κ B α , MKK4, MKK7, p53	Antiapoptótica, anti- inflamatoria
CigR	SPI3	2			
GogA	Gifsy 1	2	Proteasa		
GogB	Gifsy1	2		FBXO22	Anti-inflamatoria
GtgA	Gifsy2	2	Proteasa		
GtgE	Gifsy2	1 y 2	Proteasa		Previene el reclutamiento de Rab29
PipB	SPI5	2	Proteasa		
PipB2		2		KLC*	Extensión de Sifs
SifA		2	GEF	Rab7, RhoA, SKIP	Sifs, SIST, formación de SCV
SipA/SspA	SPI1	1		Caspasa-3, F-actina, T-plastina	Ensamblaje de actina, interrupción de las uniones estrechas, migración de PMN, posicionamiento de SCV
SipB	SPI1	1		Caspasa-1	Piroptosis
SipC/SspC	SPI1	1		Citoqueratina 8, citoqueratina 18, Exo70, F-actina, syntaxina 6	Nucleación de actina, maduración de SCV
SipD/SspD	SPI1	1			
SlrP		1 y 2	E3 ubiquitina ligasa	ERdj3, Trx	Apoptosis
SopA		1	E3 ubiquitina ligasa	Caspasa-3, HsRMA1, Uch7	Invasión, respuestas nucleares, maduración de SCV, secreción de fluidos
SopB/SigD	SPI5	1	Fosfatasa de fosfoinosítido GDI	Cdc24, Cdc42	Invasión, respuestas nucleares, maduración de SCV, secreción de fluidos
SopD		1 y 2			Invasión, inflamación, secreción de fluidos
SopD2		2			Inhibición de la formación de LNT
SopE	SopE Φ	1	GEF	Cdc42, Rab5, Rac1	Remodelación de actina, inflamación
SopE2	Fago remanente	1	GEF	Cdc42, Rac1	Remodelación de actina, inflamación

SpiC/SsaB	SPI2	2		Hook3, TassC	Inhibición de la fusión de SCV con lisosomas
SptP	SPI1	1	GAP, Fosfatasa de tirosina	Cdc42, Rac1, VCP, vimentina	Resversión de la reorganización de actina, inhibición de la activación de ERK
SpvB	Plásmido	2	Ribosiltransferasa de actina	G-actina	Despolimerización de actina, retraso de citotoxicidad. Inhibición de la autofagia
SpvC	Plásmido	1 y 2	Fosfotreonina liasa	ERK2	Inactivación de MAPK
SpvD	Plásmido	1 y 2		Xpo2	Inhibición de la respuesta inflamatoria
SrfJ	Isla <i>iol</i>	2			
SrgE		2			
SseB	SPI2	2			
SseC	SPI2	2			
SseD	SPI2	2			
SseF	SPI2	2		Placoglobina, TIP60	Formación de Sifs, posicionamiento de SCV
SseG	SPI2	2		Caprina-1, desmoplaquina	Formación de Sifs, posicionamiento de SCV
SseI/SrfH	Gifsy-2	2		Filamina A, IQGAP1, TRIP6	Modulación de la migración de la célula hospedadora
SseJ		2			
SseK1		2			
SseK2		2			
SseK3	Fago ST64B	2		TRIM32	Modulación de la vía NF-κB
SseL		2	Desubiquitinasa	IκBα, OSBP-1, talina, ubiquitina	Autofagia
SspH1	Gifsy-3	1 y 2	E3 ubiquitina ligasa	PKN1	
SspH2	Fago remanente	2	E3 ubiquitina ligasa	14-3-3γ, AIP, BAG2, Bub3, Filamina A, Profilina-1, Sgt1, UbcH5-Ub	
SteA		1 y 2			
SteB		2			
SteC		2	Quinasa		Malla de actina
SteD		2			
SteE		1 y 2			

Análisis de la translocación de los efectores de los T3SS

Para el estudio de los efectores de *Salmonella* puede usarse la infección de diferentes líneas celulares en cultivo. Las bacterias invasivas se usan para la infección de líneas celulares no fagocíticas, como las HeLa o los fibroblastos. Los macrófagos pueden usarse en las mismas condiciones para infecciones de corta duración (Fink & Cookson, 2007), pero para infecciones de varias horas es necesario el uso de bacterias no invasivas con objeto de evitar la piroptosis rápida descrita más arriba. La expresión de los T3SS1 y T3SS2 y la translocación de los efectores varían con las condiciones usadas durante el cultivo de las bacterias antes de la infección, con el tiempo post-infección (p.i.), y con la línea celular hospedadora (Hautefort *et al.*, 2008).

Para el análisis de la translocación de efectores puede utilizarse el fraccionamiento y la inmunodetección con anticuerpos contra los efectores o pequeñas etiquetas con los que se marcan los efectores. Una alternativa es la generación de fusiones con un fragmento del gen *cyaA'* de *Bordetella pertussis*, que codifica el dominio catalítico de una adenilato ciclasa dependiente de calmodulina. Esta adenilato ciclasa convierte el ATP celular en adenosín monofosfato cíclico (AMPC) en presencia de calmodulina. Debido a que la calmodulina está presente en las células eucarióticas hospedadoras, pero no en las bacterias, la translocación de una de estas fusiones se detectaría como un incremento en los niveles de AMPC en un cultivo celular infectado con *Salmonella* (Sory & Cornelis, 1994).

Para imitar, en cierta medida, los ambientes *in vivo*, pueden utilizarse los medios de cultivos sintéticos. La secreción de los efectores al medio de cultivo se analiza por inmunodetección. Para los efectores del T3SS1 se usa medio rico con alta concentración de NaCl y baja aireación (García-Calderón *et al.*, 2007; Lee & Falkow, 1990), condiciones similares al lumen del intestino. Para los efectores del T3SS2 se usa medio mínimo con baja concentración de fosfato y magnesio y pH ácido (Deiwick *et al.*, 1998; García-Calderón *et al.*, 2007), condiciones similares al interior de la SCV.

Secuencias para la secreción y translocación de efectores

Las proteínas secretadas por los T3SSs poseen una secuencia señal en los primeros aminoácidos de su secuencia proteica, gracias a los cuales se dirigen hacia los T3SSs (Sory *et al.*, 1995). Estas secuencias no están conservadas, pero comparten una composición o patrón de aminoácidos específica, lo que hace que puedan ser funcionalmente intercambiables entre muchos efectores (Anderson *et al.*, 1999). Hay pruebas que muestran cierta importancia de la secuencia del ARN mensajero (ARNm) del efector para la secreción (Sorg *et al.*, 2005) e incluso la intervención de Hfq en algunos casos (Niemann *et al.*, 2013), pero esto depende del efector en cuestión y es algo controvertido (Ghosh, 2004; Lloyd *et al.*, 2001). Un método informático basado en las propiedades fisicoquímicas de los residuos amino terminales (N-terminales) y en la frecuencia de aminoácidos de 100 efectores identificó posibles efectores con un 70% de precisión (Arnold *et al.*, 2009), sugiriendo que la secuencia aminoacídica es más importante para la secreción que la señal de ARNm. Recientemente se han publicado aproximaciones similares que demuestran la validez del método en la predicción de efectores [revisado en (McDermott *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013)].

Existen efectores, como SipB de *Salmonella*, donde la región C-terminal es importante también para la secreción específica a través del T3SS. El dominio N-terminal (160 residuos) de SipB se secreta a través del flagelo pero cuando tiene unido el C-terminal lo hace a través del T3SS1 (Kim *et al.*, 2007). El extremo C-terminal se requiere también en los efectores SifA (Brown *et al.*, 2006) y SipC (Chang *et al.*, 2005) de *Salmonella*.

Algunos efectores presentan una región proteica, en los 50-100 aminoácidos del extremo N-terminal, que proporciona el sitio de unión para chaperonas de secreción de tipo III (Feldman & Cornelis, 2003). Se han descrito cuatro funciones de estas chaperonas, (i) impiden la degradación prematura de los sustratos de los T3SS (Fu & Galán, 1998), (ii) promueven el reconocimiento de los efectores por componentes del T3SS (Lee & Galán, 2003), (iii) contribuyen a la jerarquía en la translocación de proteínas efectoras (Lara-Tejero *et al.*, 2011) y (iv) actúan como coactivadores de reguladores transcripcionales de los T3SSs (Büttner, 2012). Dos efectores que dependen de estas chaperonas son SptP y SopE, los cuales, en ausencia de su sitio de unión a chaperona, se translocan a través de la vía del flagelo (Lee & Galán, 2004).

Por último, hay efectores que requieren la acción de la ATPasa del T3SS para su translocación. SptP, unida a su chaperona SicP, interacciona con la ATPasa del T3SS1, InvC, que disocia la unión SptP-SicP permitiendo que SptP acceda a la aguja del sistema de secreción (Akedo & Galán, 2005). La unión del complejo SptP-SicP con, la ATPasa, InvC se produce a través de la chaperona SicP. También hay ejemplos de unión directa del efector con la ATPasa, como es el caso de SopD, que interacciona con InvC a través de su región C-terminal (Boonyom *et al.*, 2010).

PipB2

PipB2 se describió como un efector del T3SS2 (Knodler *et al.*, 2004) que posee similitud de secuencia con un efector ya conocido, PipB (Knodler *et al.*, 2002). PipB2 se sintetiza bajo condiciones de expresión del T3SS2 y durante la infección de macrófagos (Eriksson *et al.*, 2002), en los que se localiza en las SCV y en Sifs a 12 horas post-infección (hpi).

PipB2 reorganiza los compartimentos de endosomas tardíos y lisosomas en las células de mamíferos lo que da lugar a la extensión centrífuga de los Sifs desde las SCV a lo largo de los microtúbulos. Esta actividad es una consecuencia de su actividad de unión a la kinesina-1 (Henry *et al.*, 2006). SifA, otro efector del T3SS2, posee una actividad antagónica a PipB2 al regular negativamente el reclutamiento de kinesina-1 (Henry *et al.*, 2006). PipB2 promueve el movimiento hacia el exterior de la SCV cuando se inhibe la actividad de la miosina II (Wasylnka *et al.*, 2008). El posicionamiento característico de las SCVs en regiones yuxtannucleares sugiere que la acción inhibitoria sobre la kinesina-1, por parte de SifA, puede ser dominante sobre los efectos de PipB2 a 8-14 hpi. Sin embargo, en las etapas posteriores de la infección de células epiteliales hay un desplazamiento hacia fuera de una proporción significativa de SCVs que depende de los microtúbulos, kinesina-1 y PipB2, y que está implicado en la propagación de *Salmonella* de célula a célula durante la infección. En un escrutinio reciente se ha identificado PipB2 como uno de los efectores de *Salmonella* implicados en la inhibición de la migración de células dendríticas hacia un estímulo quimiotáctico (McLaughlin *et al.*, 2014). Entre los efectores producidos por *S. enterica* serovar Typhimurium cuando está en estado durmiente en el interior de fibroblastos se encuentra PipB2, que en estas condiciones no se localiza fuera del compartimento vacuolar (Núñez-Hernández *et al.*, 2014).

SseK1

La proteína SseK1 se identificó como sustrato de T3SS de *S. enterica* serovar Typhimurium debido a su similitud con los efectores ya conocidos Z4328 de *E. coli* enterohemorrágica y NleB *Citrobacter rodentium* (Kujat Choy *et al.*, 2004). La translocación se observó mediante la clonación del gen *sseK1* y su promotor en un plásmido formándose una proteína fusión SseK1-CyaA', se infectaron células epiteliales HeLa y se midió la translocación a 1 y 9 hpi, observándose la translocación solo a 9 hpi, por lo que se concluyó que SseK1 era un efector dependiente del T3SS2. Este efector mostraba una localización citosólica en la célula hospedadora.

Existen al menos dos parálogos de SseK1 en diversos serotipos de *S. enterica*: SseK2 (Kujat Choy *et al.*, 2004), que comparte un 61% de identidad en la secuencia de aminoácidos con SseK1; y SseK3 (Brown *et al.*, 2011), que está codificado en el profago ST64B y que posee una identidad del 75% con SseK2. Debido a su gran similitud son consideradas miembros de la misma familia de efectores y se predice que tienen funciones redundantes. Sin embargo se desconocen las funciones específicas de estas proteínas en las células hospedadoras y existen estudios contradictorios sobre su relevancia en la replicación intracelular de *Salmonella* y sobre su papel en la virulencia en ratones. En un estudio, sobre la contribución de algunos efectores de T3SS2 a la replicación en células hospedadoras, se observó que un triple mutante *sseK1 sseK2 sseK3* tenía niveles de crecimiento en macrófagos RAW264.7 significativamente reducidos pero no se observó ninguna disminución en el número de bacterias en órganos diana en ratones después de una infección oral (Buckner *et al.*, 2011). Por el contrario, otro estudio mostró una atenuación significativa de dicho mutante en ratones, pero no detectó defectos de crecimiento intracelular (Brown *et al.*, 2011). Recientemente se ha identificado TRIM32, una ligasa de ubiquitina del hospedador, como una diana de interacción de SseK3 a través de la cual podría modular la actividad de la vía NF- κ B (Yang *et al.*, 2015).

OBJETIVOS

En *S. enterica* existen más de 40 proteínas efectoras que pueden ser translocadas por el T3SS1 o el T3SS2. En la presente tesis se realiza una contribución al estudio de algunas de esas proteínas. Por un lado, se ha tratado de poner a punto sistemas de análisis de la translocación de efectores. Por otro lado, se ha abordado el estudio concreto de SseK1, un efector poco conocido que cuenta con parálogos en *S. enterica* y con ortólogos en otras especies patógenas Gram negativas. Los objetivos específicos del trabajo se enumeran a continuación:

- (i) Análisis de la translocación de efectores mediante la generación de fusiones CyaA' aleatorias y dirigidas.
- (ii) Estudio de la contribución a la virulencia del efector SseK1 en un modelo animal.
- (iii) Análisis de la translocación del efector SseK1 en distintos tipos celulares.
- (iv) Determinación de los factores genéticos y ambientales que controlan la expresión del gen *sseK1* de *S. enterica* serovar Typhimurium.
- (v) Identificación de proteínas humanas capaces de interaccionar con el efector SseK1.
- (vi) Análisis transcriptómico del efecto de SseK1 en células humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Estirpes bacterianas

Todas las estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium y *E. coli* usadas en esta tesis se incluyen en la **Tabla M.1**. Las estirpes de *S. enterica* derivan de la estirpe virulenta en ratones ATCC 14028, también conocida como 14028.

Tabla M.1: Estirpes bacterianas usadas en esta tesis

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
HB101	<i>F⁻ mcrB mrr hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm^R) glnV44 λ⁻</i>	(Boyer & Roulland-dussoix, 1969)
M15	<i>lac ara gal mtl</i>	Qiagen
S17-1 λpir	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 kpir</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
TP610	<i>F⁻, thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 hsdR hsdM recBC lop-11 lig⁺ cya-610</i>	(Hedegaard & Danchin, 1985)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δlac-pro/F⁺ proAB lacIq lacZΔM15 Tn10, Tcr</i>	(Bullock, 1987)
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium		
14028	Estirpe silvestre ATCC	
55130	<i>phoQ24</i>	(Kier <i>et al.</i> , 1979)
SV4536	<i>dam-230</i>	(Prieto <i>et al.</i> , 2009)
SV4608	<i>trg::MudJ, Km^r</i>	(García-Calderón <i>et al.</i> , 2007)

SV4699	<i>phoP7953::Tn10, Tc^r</i>	(Groisman <i>et al.</i> , 1989)
SV4757	<i>rscC54</i>	(García-Calderón <i>et al.</i> , 2005)
SV5030	$\Delta slrP::Cm$	Colección del laboratorio
SV5049	$\Delta rcsB::Cm$	(García-Calderón <i>et al.</i> , 2007)
SV5373	$\Delta hilA$	Colección del laboratorio
SV5452	$\Delta ssrB::Cm$	(García-Calderón <i>et al.</i> , 2007)
SV6017	$\Delta SPI-2::Cm$	Esta tesis
SV6055	$\Delta SPI-1::Km$	Esta tesis
SV6062	$\Delta SPI-1$ Derivada de SV6055	Esta tesis
SV6063	$\Delta SPI-2$ Derivada de SV6056	Esta tesis
SV6106	$\Delta SPI-1 \Delta SPI-2$	Esta tesis
SV6151	$\Delta SPI-1 \Delta SPI-2 \Delta slrP::Cm$	Esta tesis
SV6402	$\Delta hilD::Cm^r$	Colección del laboratorio
SV6619	$\Delta slrP::Cm^r pipB2::miniTn5cyaA'$	Esta tesis
SV7070	$\Delta sseK1::Km$	Esta tesis
SV7071	$\Delta sseK1::3xFLAG, Km$	Esta tesis
SV7179	$\Delta sseK1$	Esta tesis
SV7381	$sseK1::cyaA', Km$	Esta tesis
SV8165	$sseK1::lacZ$ (fusión traduccional)	Esta tesis

● Congelación y descongelación de estirpes bacterianas

70 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) se añadieron a un mililitro de cultivo bacteriano en fase estacionaria y el vial se guardó a -80°C. Los viales se descongelaron lentamente en hielo.

Estirpes de levaduras

En este estudio se ha empleado la estirpe L40 de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo genotipo es *MAT α trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ*

● Congelación y descongelación de estirpes de levaduras

500 μ l de glicerol 50% se añadieron a 700 μ l de cultivo saturado de levaduras. El vial se guardó a -80°C. Las estirpes se congelaron en medio rico, a no ser que fueran portadoras de un plásmido en cuyo caso se congelaron en medio mínimo SD suplementado con los requerimientos apropiados. Los viales se descongelaron lentamente en hielo.

Bacteriófagos

Como bacteriófago transductor se usó P22 HT105/1 *int-201* (Schmieger, 1972). Para los ensayos de sensibilidad a P22 se usó el derivado H5, que porta una mutación en el gen *c2*. Dicho gen de P22 es un equivalente del gen *cI* del fago λ . Así, un mutante *c2* produce calvas de lisis claras.

Líneas de células de mamíferos

En este estudio se han utilizado diversas líneas celulares de mamífero: (i) HeLa (ECAC no. 93021013), línea de células epiteliales humanas, y las líneas derivadas de ésta, transfectadas establemente, HeLa pBABE-puro y diversos clones independientes HeLa pBABE-puro-SseK1-3xFLAG; (ii) RAW264.7 (ECACC no. 91062702), línea de macrófagos procedente de un tumor de ratón inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson; (iii) NRK-49F (ATCC CRL1570), línea de fibroblastos de hígado de rata; (iv) Cos-7 (ATCC CRL-1651), línea de fibroblastos de mono; (v) NIH3T3 (ATCC CRL-1658), línea de fibroblastos de ratón, (vi) J774A.1 (ATCC TIB-67), línea de macrófagos de ratón y (vii) Caco2 (ATCC HTB-37), línea epitelial humana.

● Congelación y descongelación de líneas celulares de mamífero

Se pusieron en cada vial de congelación entre 5×10^6 y 10^7 células resuspendidas en 1,5 ml de medio de congelación¹. El vial se mantuvo 2 h a -20°C, 24 h a -80°C y, finalmente, se guardó en una atmósfera de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, los viales se introdujeron en agua a temperatura ambiente durante pocos minutos (hasta la descongelación). Posteriormente, las células se diluyeron en 10 ml de medio de cultivo, se centrifugaron 10 min a 1000 rpm, se resuspendieron en medio fresco y se transfirieron a una placa de cultivo.

Ratones

Para los ensayos de virulencia se usaron ratonas BALB/c de 7 semanas (*Charles River Laboratories*, Santa Perpetua de Mogoda, España).

CONDICIONES, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Bacterias

- **Condiciones de cultivo bacteriano**

Las condiciones habituales de cultivo fueron 37°C (30°C para algunos experimentos concretos) con agitación (200 rpm). Para condiciones de microaerofilia, las bacterias se cultivaron a 37°C sin agitación en tubos de plástico de 10 ml de capacidad.

- **Soluciones y medios para bacterias**

Una variante del medio LB¹ (*lysogeny broth*) se usó como medio rico (Bertani, 1951; Maloy, 1990) y el medio mínimo LPM (*low phosphate, low magnesium-containing medium*)², como imitador de las condiciones existentes en la SCV de *S. enterica* (Coombes *et al.*, 2004). El agar se añadió a una concentración de 15 g/l para el medio sólido. Para conseguir las condiciones de máxima invasividad de *Salmonella* se usó medio rico LB con 0,3 M de NaCl y se cultivaron las bacterias en microaerofilia.

¹ **LB**: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro de H₂O destilada.

² **LPM**: KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7,5 mM, K₂SO₄ 0,5 mM, casaminoácidos 0,1%, glicerol 38 mM, MES 80 mM, K₂HPO₄ /KH₂PO₄ 337,5 µM, MgCl₂ 8 µM. Se llevó a pH 5,8 con KOH.

El medio mínimo E³ agar (Vogel & Bonner, 1956) se usó para la conjugación bacteriana en la mutagénesis aleatoria con el plásmido pUT/miniTn5-cyaA'.

El medio de cultivo líquido SOB⁴ sin Mg (Hanahan *et al.*, 1991) se utilizó para el crecimiento bacteriano de las electrocompetentes que se usaron en la mutagénesis de inactivación de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR.

El agar EBU⁵ (Maloy, 1996) se utilizó para la limpieza de lisógenos tras el protocolo de transducción; el agar MacConkey⁶ sin lactosa y suplementado con 1% de maltosa se usó para la selección de los transformantes TP610.

El agar NCE⁷ (Berkowitz *et al.*, 1968) suplementado con triptófano 0,01 %, uracilo 0,01 %, prolina 0,01%, tiamina 1 mM y Ap 50 µg/ml se usó para seleccionar la estirpe HB101 de *E. coli* transformada con plásmidos derivados de pGAD1318 correspondientes a los candidatos del doble híbrido.

En la **Tabla M.2** se muestra una lista de agentes selectivos y otros compuestos químicos, junto a las concentraciones a las que se utilizaron.

Tabla M.2: Concentraciones de agentes selectivos y de otros compuestos químicos utilizados en los medios de cultivo bacterianos.

Compuesto	Mecanismo de acción	Preparación	Medio rico (µg/ml)	Medio mínimo (µg/ml)
Antibióticos				
Ampicilina (Ap)	Bactericida Inhibición de la síntesis de la pared celular	100 mg/ml en H ₂ O Esterilizar por filtración Mantener a 4°C	100	50
Cloranfenicol (Cm)	Bactericida o bacteriostático Inhibición de la síntesis proteica	100 mg/ml en etanol 96%. Mantener a -20°C	20	5
Kanamicina (Km)	Bactericida Inhibición de la síntesis proteica	50 mg/ml en H ₂ O Esterilizar por filtración Mantener a 4°C	50	125
Tetraciclina (Tc)	Bacteriostático a las dosis habituales; bactericida a altas dosis Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, inhibición de la síntesis	4 mg/ml en etanol 50% Esterilizar por filtración Guardar en oscuridad a -20°C	20	10

³ **Medio E:** Añadir 20 ml de sales E 50X y 40 ml de glucosa 50% a un volumen de 940 ml de H₂O con 15 g de agar autoclavado.
Sales E50x: MgSO₄ 83mM, ácido cítrico 520mM, K₂HPO₄ 2,87M, y NaNH₄HPO₄ 837,3mM

⁴ **SOB-Mg:** 20 g/l de tripton, 5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl y 0,19 g/l de KCl. Se llevó a pH 7 con NaOH 10 M, se autoclavó.

⁵ **EBU:** LB al que se añaden, por cada 100 ml de medio, 0,5 ml de glucosa al 50%, 1 ml de K₂HPO₄ al 25%, 125 µl de azul de Evans al 1% y 250 µl de uranina (también llamada fluoresceína) al 1%.

⁶ **MacConkey:** se uso el medio de la casa comercial Difco.

⁷ **NCE:** A 1 l de agar 2% en agua autoclavado añadir 20 ml de sales NCE 50X, 4 ml de glucosa 50% y 1 ml de MgSO₄ 1M.
Sales NCE 50X: K₂HPO₄ 1,4 M, KH₂PO₄ 1,45 M, NaNH₄HPO₄ 850 mM.

	proteica y alteración en la membrana plasmática			
Otros compuestos				
EGTA	Quelante de Ca ²⁺	1 M en H ₂ O Mantener a temperatura ambiente	0,003804	0,003804
X-Gal	Hidrolizado por la β-galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol. Éste último, al oxidarse, genera un compuesto azul insoluble	20 mg/ml en dimetilformamida Guardar en oscuridad a -20°C	40	25

Levaduras

● Condiciones de cultivo de levaduras

Las levaduras se cultivaron a 30°C. En el caso de cultivos en medio líquido, se hizo con agitación (200 rpm) para favorecer la aireación.

● Soluciones y medios para levaduras

Los medios ricos usados para cultivar las levaduras fueron YPD⁸ e YPDA⁹.

Como medio de selección de transformantes se usó el medio DO que es medio mínimo SD¹⁰ suplementado con una mezcla de todos los posibles suplementos (*drop-out*) a excepción de aquellos para los que se quiere realizar la selección. Normalmente se empleó una mezcla comercial (Formedium) a la concentración indicada por el fabricante. En ocasiones fue necesario añadir suplementos preparados en el laboratorio según se indica en la **Tabla M.3** Los medios sólidos se prepararon añadiendo un 2% de agar antes de ser autoclavados.

Tabla M.3: Suplementos para el medio mínimo de levaduras.

Suplementos para 1 L medio mínimo	
· Adenina 0,2 %	10 ml
· Triptófano 1 %	2 ml
· Histidina 1 %	2 ml
· Leucina 2 %	6 ml

⁸ **Medio rico YPD:** 1% de extracto de levadura, 2% de bacto-peptona, 2% de glucosa.

⁹ **Medio rico YPDA:** YPD suplementado con 20 mg/l de adenina.

¹⁰ **Medio mínimo SD:** base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco) 1,5 g/l, sulfato amónico 5 g/l, glucosa 20 g/l.

Líneas celulares

● Condiciones de cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en un incubador *Biotech Galaxy* a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Se usaron placas de cultivo de 10 cm de diámetro (con 10 ml de medio de cultivo) o 15 cm de diámetro (con 20 ml de medio de cultivo), o placas multipocillos de 6 pocillos (3 ml por pocillo), 24 pocillos (1 ml por pocillo) o 96 pocillos (100 µl por pocillo). Las células se subcultivaron 2 veces por semana, para el caso de epiteliales y fibroblastos, o 3 veces por semana, para el caso de macrófagos. Para ello, las células HeLa, NRK-49F, Cos-7, NIH3T3 y Caco2, por ser células adherentes, se despegaron mediante tripsinización, retirando el medio de cultivo, lavando las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS¹¹) y añadiendo 1 ml de tripsina (diluida la tripsina 10x en PBS). Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 10 minutos y se recogieron en medio fresco; las células RAW264.7 y J774A.1, por ser células semi-adherentes, se lavaron y despegaron con raspadores (1,3 cm, SPL Life Sciences) y se recogieron en medio fresco.

● Soluciones y medios para células de mamífero

El medio de cultivo usado para las líneas celulares de mamífero fue el medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Biowest) suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente inactivado¹², L-glutamina 2 mM, penicilina 60,3 µg/ml y estreptomicina 100 µg/ml. En los experimentos de infección con *Salmonella* no se añadieron antibióticos al medio.

MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN

Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta tesis se describen en la **Tabla M.4**.

Tabla M.4: Plásmidos utilizados en esta tesis. El prefijo pIZ está registrado a nombre del profesor J. Casadesús en el Plasmid Reference Center, Universidad de Standford, California.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
----------	----------------------------	------------

¹¹ **PBS 10x:** NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 43 mM, KH₂PO₄ 14 mM. Ajustar el pH a 7,3.

¹² **Inactivación del suero:** el suero se incubó a 56°C durante 30 min. De este modo se inactivan las proteínas del complemento, las cuales podrían producir la lisis de las células tumorales.

pBABE-puro	Vector para transfecciones estables Amp ^R	(Morgenstern & Land, 1990)
pCE36	<i>aph FRT lacZY+ this oriR6K</i>	(Ellermeier <i>et al.</i> , 2002)
pCE40	<i>aph FRT 'lacZ lacY+ this oriR6K bla</i>	(Ellermeier <i>et al.</i> , 2002)
pCP20	<i>bla cat cI857 λP_R flp pSC101 oriTS</i>	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
pGAD1318	Vector para doble híbrido	(Van Aelst, 1998)
pIC552	Vector para fusiones transcripcionales <i>lacZ</i> , Ap ^R	(Macián <i>et al.</i> , 1994)
pIZ1673	pSIF003-R1 <i>ΔlacI</i>	(Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2011)
pIZ1907	pIZ1673-PipB2(1–350)	Esta tesis
pIZ1908	pIZ1673-PipB2(11–350)	Esta tesis
pIZ1911	pIZ1673-PipB2(1–10)	Esta tesis
pIZ1913	pIZ1673-PipB2(1–48)	Esta tesis
pIZ1947	pIZ1673-PipB2(1–100)	Esta tesis
pIZ1948	pIZ1673-PipB2(1–225)	Esta tesis
pIZ1949	pQE30-phoP	(Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2013)
pIZ1959	pIZ1673-SseK1(1-336)	Esta tesis
pIZ2095	pIC552- <i>PsseK1</i> (–500/+40)	Esta tesis
pIZ2112	pIC552- <i>PsseK1</i> (–500/+40)TT–73/–72CC	Esta tesis
pIZ2115	pSB377- <i>PsseK1</i> (–500/+40)	Esta tesis
pIZ2135	pSB377- <i>PsseK1</i> (–500/+40)TT–51/–50CC	Esta tesis
pIZ2136	pSB377- <i>PsseK1</i> (–500/+40)TT–62/–61CC	Esta tesis
pIZ2137	pSB377- <i>PsseK1</i> (–500/+40)TT–73/–72CC	Esta tesis
pIZ2154	pIC552- <i>PsseK1</i> (–500/+40)TT–62/–61, –73/–72CC	Esta tesis
PIZ2047	PBABE-puro-SseK1-3xFLAG	Esta tesis
pIZ2203	pLEX10-SseK1	Esta tesis
pKD3	<i>bla FRT cat FRT PS1 PS2 oriR6 K</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS2 oriR6 K</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD13	<i>bla FRT aph FRT PS1 PS4 oriR6K</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD46	<i>bla P_{BAD} gam bet exo pSC101 oriTS</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pLEX10	Vector para doble híbrido	(Selig <i>et al.</i> , 1997)
pREP4	<i>lacI</i> , Km ^R	Qiagen
pSB377	Vector para fusiones transcripcionales <i>luxCDABE</i>	(Winson <i>et al.</i> , 1998)
pSUB11	Vector para fusiones 3xFLAG, Km ^R	(Uzzau <i>et al.</i> , 2001)
pUTmini-Tn5cyaA'	Suicide delivery plasmid for mini-Tn5cyaA	(Tu <i>et al.</i> , 2001)

Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

● Extracción de ADN plasmídico para clonaciones

Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el protocolo de lisis alcalina (Birboim, 1983); con ligeras modificaciones. Habitualmente se realizaron minipreparaciones a partir de 4,5 ml de cultivo. Las células se recogieron tras tres centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante 30 s. El sedimento se resuspendió en 100 µl de Solución P1¹³ fría, se lisó con 200 µl de Solución P2¹⁴ preparada en el instante (a temperatura ambiente, para evitar la precipitación del SDS), se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y se incubó 5 min en hielo. Se neutralizó con 150 µl de Solución P3¹⁵ fría, se mezcló suavemente, y se incubó en hielo 5 min. Los restos celulares, que formaron un moco blanco, se sedimentaron por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se extrajo con igual volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) hasta conseguir una interfase limpia y se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 96%. Se agitó suavemente y, tras incubar 30 min como mínimo a -20°C, se centrifugó 15 min en una microcentrífuga a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó 1 min en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante, se secó al vacío y se resuspendió en 30 µl de TER¹⁶ o agua bidestilada (H₂Odd).

● Extracción de ADN plasmídico para secuenciación

Se usó el sistema comercial *DNA-spin plasmid DNA purification kit* suministrado por Intron biotechnology siguiendo las instrucciones del fabricante.

● Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Se realizaron minipreparaciones a partir de 4,5 ml de cultivo en medio selectivo líquido. Las células se recogieron en microtubos mediante tres centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante 15 s. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de TE¹⁷. Se añadieron 200 µl de solución de lisis¹⁸, 200 µl de

¹³ Solución P1: EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8, ARNasa 100 µg/ml.

¹⁴ Solución P2: NaOH 200 mM, SDS 1%.

¹⁵ Solución P3: acetato potásico 3 M. Ajustar a pH 5.5 con ácido acético glacial.

¹⁶ TER: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8, ARNasa 20 µg/ml.

¹⁷ TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM.

¹⁸ Solución de lisis: Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA 1 mM.

fenol:cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 0,3 g de bolas de vidrio¹⁹ y se agitó durante 2 min en agitador de vórtice o durante 15 min en *multishaker*. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo. Se añadieron 0,1 volumen de acetato de potasio 5 M y 2 volúmenes de etanol 100 % frío. Tras 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó 5 min a 13000 rpm y el sedimento se lavó con etanol 70 %. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 50 µl de H₂Odd.

Un microlitro de esta preparación se usó para transformar células competentes de *E. coli* mediante electroporación.

Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de las compañías Roche Diagnostics GmbH, Takara, New England Biolabs y Promega Biotec. En cada caso, se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

Para la desfosforilación de plásmidos se empleó la fosfatasa alcalina (Roche) añadiendo 1 U de fosfatasa directamente a la mezcla de restricción e incubando durante 60 min a 37°C. Se detuvo la reacción corriendo la muestra en un gel de agarosa y purificando la banda mediante columnas de purificación.

Para ligar fragmentos de ADN se usó 1 U de ADN ligasa de T4 (1 U/µl, Roche) en el tampón suministrado por el fabricante. Habitualmente, la mezcla se incubó un mínimo de 12 horas a 16°C.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis en un gel de agarosa sumergido en tampón TAE²⁰ se empleó para determinar la eficiencia de las extracciones de ADN, observar el patrón de cortes tras la digestión de plásmidos, estimar la eficacia de la digestión con una endonucleasa, etc.

¹⁹ **Bolas de vidrio:** Diámetro 0,45-0,52 mm. Las bolas se lavan con ácido nítrico durante una noche y posteriormente se lavan varias veces con H₂Odd y se dejan secar en el horno.

²⁰ **TAE:** Tris-40 mM, EDTA 1 mM, pH 7,7 con acético

La agarosa empleada fue de baja electroendosmosis (Pronadisa) y su concentración varió entre el 0,7 % y el 1,5 %, dependiendo de la gama de tamaños de los fragmentos que se pretendía separar. El tampón de carga utilizado fue el comercial suministrado por la empresa Takara.

Como patrón de peso molecular se empleó la escalera de 1 kb (GIBCO, BRL, Life Technologies). Las muestras se mezclaron con 1/10 de volumen de tampón de carga. Para hacer visibles las bandas se añadió bromuro de etidio al gel a una concentración final de 0.5 µg/ml. Los geles se iluminaron con un transiluminador de radiación ultravioleta (UV) y se fotografiaron empleando una película instantánea Polaroid ISO 3000/36, alternativamente se transiluminaron y fotografiaron digitalmente en el *GelDoc* de *BioRad*

Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Generalmente, se usó el sistema comercial *MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit*, suministrado por Intron biotechnology. En el caso de bandas de ADN de tamaño menor de 100 pb se procedió al aislamiento mediante *gene-clean*. Para ello, se añadió al bloque de agarosa el equivalente a 2-3 volúmenes (unos 300 µl) de NaI 6 M y se calentó a 55°C hasta la fusión de la agarosa. Se añadieron 10 µl de sílica 100 mg/ml (Sigma-Aldrich) y se mantuvo en hielo durante 5 min. Se centrifugó a máxima velocidad durante 20 s, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de tampón de lavado²¹, tras lo cual se mezcló en un agitador de vórtice. Se volvió a centrifugar y se repitió el proceso de lavado dos veces más. Se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el sedimento, que, posteriormente, se resuspendió en 15 µl de H₂O dd. Se incubó durante 10 min a 55°C, se centrifugó durante 30 s a 13000 rpm, se recogió el sobrenadante y se repitió el paso de resuspensión, tras lo que se reunió el nuevo sobrenadante con el sobrenadante anterior.

Transformación

● Transformación de *E. coli* con quimiocompetencia

²¹ **Tampón de lavado:** Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, EDTA 2 mM pH 8.0 y etanol al 53%.

Se prepararon células quimiocompetentes según el método de la casa comercial Qiagen que permite una alta frecuencia de transformación (entre 5×10^7 y 5×10^8 transformantes por μg de ADN plasmídico). Un cultivo saturado de la estirpe receptora (DH5 α , TP610, XL1-Blue, M15) se diluyó 100 veces en 100 ml de medio LB en un matraz de 250 ml. Se incubó en agitación a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ aproximada de 0,5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo y se incubó durante 5 min. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g a 4°C durante 5 min. El sedimento se resuspendió en 30 ml de TFB1²² frío y se incubó en frío 90 min. Las células se recogieron por centrifugación a 4000 g a 4°C durante 5 min y se resuspendieron en 4 ml de TFB2²³ frío. Se prepararon alícuotas de 100-200 μl que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Las células así preparadas mantienen su competencia durante varios meses.

Para la transformación, una alícuota de células competentes se descongeló lentamente en hielo y se mezcló con la preparación de plásmido. Dicha mezcla se incubó en hielo 20 min y, a continuación, se sometió a choque térmico (42°C, 90 s), se añadió 500 μl de LB o Psi broth²⁴. La mezcla se incubó a 37°C durante 60-90 min, tras lo cual se concentró en 100 μl y se sembró en una placa de medio selectivo.

● Electroporación en *E. coli* y *S. enterica*

El método fue el mismo para ambas especies: se diluyó 100 veces en LB un cultivo saturado y se cultivó a 37°C ó 30°C, según la estirpe, hasta una DO₆₀₀ aproximada de 0,6-0,8. Tras esto, el cultivo se incubó 5 min en hielo, se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 4°C, 4000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron suavemente en 1 ml de H₂O fría y estéril. Se rellenó el tubo con más H₂O (4 ml por número de muestras que se quisiera electroporar) y se centrifugó en las mismas condiciones. Se repitió la operación y las células se resuspendieron en 40 μl /muestra de H₂O fría y estéril y se dejaron en hielo hasta el momento de ser usadas. Con este procedimiento se obtuvieron células electrocompetentes. La electroporación se realizó mezclando 1 μl de ADN plasmídico con 40 μl de células electrocompetentes y transfiriendo la mezcla a una cubeta (con distancia entre placas de 2 mm) previamente enfriada. A continuación, se sometió a una descarga eléctrica en el electroporador (25 μF , 200 Ω y 2.5 kV). El electroporador empleado fue un *Electrocell Manipulator 600* fabricado por BTX. Se añadió 1 ml de LB a la cubeta y la mezcla se transfirió a un microtubo, el cual se agitó a

²² TFB1: RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, acetato de potasio 30 mM, CaCl₂ 10 mM, 15% glicerol, pH 5.8.

²³ TFB2: MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15%, pH 6.8 con KOH.

²⁴ Psi broth: Medio LB al que se le añade MgSO₄ 4 mM, KCl 10 mM.

37°C durante 1 h. Tras esto, las células se recogieron por centrifugación, se concentraron y se sembraron en medio selectivo.

- **Transformación de levaduras a partir de biomasa en medio sólido**

Se preparó la mezcla de transformación mezclando 720 µl de PEG3350 (preparado al 50% en acetato de litio 0,1 M en TE) con 180 µl de acetato de litio 0,1 M en TE y 100 µl de DTT. En un microtubo se pusieron 100 µl de la mezcla de transformación con un poco de biomasa de la estirpe que se iba a transformar y 0,5-2 µg de ADN plasmídico. Se incubó 10 min a temperatura ambiente, 30 min a 45°C en un termobloque y se sembró en medio selectivo.

- **Transformación de levaduras con genoteca para doble híbrido en medio líquido**

Para la transformación de la estirpe de levadura L40/pLEX10-SseK1 se siguió el método del acetato de litio (Sherman *et al.*, 1986) con modificaciones. Se tomó una colonia de la levadura L40/pLEX10-SseK1 y se resuspendió en 5 ml de medio DO -Trp, se añadieron esos 5 ml a un matraz de 250 ml con 45 ml de medio DO-Trp, se incubó 5-6 horas y se pasaron los 50 ml de cultivo a un matraz de 2 L con 200 ml de medio selectivo. Se incubó este cultivo diluido toda la noche y se recogió cuando llegó a una concentración de 1×10^7 - 2×10^7 células/ml. Se recogieron las levaduras por centrifugación a 2000 rpm 5 min (el sobrenadante se desechó en el matraz del cultivo y se volvió a centrifugar para rescatar las levaduras que pudieran quedar en el fondo). Se realizaron dos lavados, con 50 ml de agua destilada, por centrifugación a 2000 rpm 5 min (el sobrenadante de cada centrifugación se desechó en el matraz del cultivo y se volvió a centrifugar para rescatar las levaduras que pudieran quedar en el fondo o que no hubiesen precipitado en la centrifugación). Se lavó con 50 ml de LiOAc 0,1 M en TE centrifugando a 2000 rpm 3 min y se resuspendió en 10 ml de LiOAc 0,1 M/TE. Se incubó 1 h a 30 °C. Se centrifugó a 2000 rpm 5 min y se resuspendió en 2 ml de LiOAc 0,1M/TE , se añadió 60 µg de ADN de la genoteca y 20 ml de PEG3350 40% en LiOAc 0,1M/TE. Se incubó la mezcla 1 h a 30°C en agitación suave (50 rpm). Se incubó en el baño a 42°C durante 30 min. Se centrifugó a 3500 rpm 5 minutos (el sobrenadante se desechó en el matraz del cultivo y se volvió a centrifugar para rescatar las levaduras que quedaron en el fondo). Se resuspendió en 50 ml de medio DO-Trp y se repitió el proceso de centrifugación y lavado dos veces. Se pasaron las células de la última resuspensión a un matraz de 2 L con 200 ml de medio DO-Leu-Trp y se incubó durante 6 h a 30°C. Se centrifugó a 3500 rpm 5 minutos (el sobrenadante se desechó en el matraz del cultivo y se volvió a centrifugar para rescatar las levaduras que

quedaron en el fondo). Se resuspendió en 50 ml de medio selectivo, se repitió el proceso de centrifugación y lavado dos veces más y por último se resuspendió en 2 ml de medio DO-Leu-Trp. Se calculó el volumen total y se sembraron 200 µl en cada placa de 150 mm con medio selectivo DO-His-Leu-Trp con agar. Se reservaron 200 µl para realizar diluciones seriadas y sembrarlas en placas de 100 mm con medio selectivo DO-Leu-Trp con agar, para poder calcular la eficiencia de la transformación.

Transducción bacteriana

● Preparación de lisados P22

Se mezclaron 0,8 ml de caldo de fagos²⁵ P22 con 0,2 ml de un cultivo saturado de la estirpe donadora. La mezcla se incubó 8-16 h con agitación suave a 37°C (8 h suele ser el tiempo idóneo para que haya lisis celular máxima, aunque el cultivo no se aclara). Los fagos se recogieron centrifugando el lisado 5 min a 13000 rpm en una centrífuga de sobremesa. El sobrenadante con los fagos se recogió en un tubo con tapón de rosca. Se añadieron 100 µl de cloroformo y se mezcló en un agitador de vórtice. Los lisados se mantuvieron unas horas a temperatura ambiente y luego se guardaron a 4°C, condiciones en las que son estables durante meses o años (Maloy, 1990).

● Transducción en medio líquido

En un tubo estéril se mezcló una alícuota de un cultivo saturado de la estirpe receptora con una dilución adecuada del lisado de la estirpe donadora. La mezcla se incubó a 37°C con agitación suave entre 30 y 90 min, dependiendo del marcador a transducir. La mezcla, diluida y sin diluir, se sembró en medio selectivo y se incubó a 37°C hasta la aparición de colonias.

Este método no proporciona transductantes independientes (aunque en incubaciones menores de 30 min apenas da tiempo a que los transductantes se dividan, por lo que la proporción de gemelos debe ser mínima), sin embargo tiene las ventajas de ser más rápido y repetitivo y de permitir diluciones de la mezcla de transducción, con lo que se pueden usar distintas multiplicidades de infección para una misma transducción.

²⁵ **Caldo de fagos1:** 100 ml de NB (Nutrient Broth), 2 ml de sales E 50x, 1 ml de glucosa al 20% y 0.1 ml de lisado de fago obtenido sobre una estirpe silvestre de *Salmonella*.

Sales E50x: MgSO₄ 83mM, ácido cítrico 520mM, K₂HP0₄ 2,87M, y NaNH₄HP0₄ 837,3mM.

NB: para 1 L de medio, añadir 3 g de extracto de carne y 5 g de peptona.

● Limpieza de lisógenos en los transductantes

Los transductantes, además de haber recibido el marcador seleccionado, pueden haber sido infectados por P22. Por tanto, pueden ser pseudolisógenos (al impedir la integración, la mutación *int* dificulta o retrasa la formación de lisógenos verdaderos). Con el tiempo, los pseudolisógenos se hacen resistentes o inmunes a nuevas infecciones por P22 y, a partir de ese momento, no pueden ser lisados ni transducidos. De ahí que convenga eliminar los pseudolisógenos de la estirpe recién construida si ha de ser usada en posteriores experimentos de transducción. Para ello, se aíslan colonias del transductante en placas de EBU. En este tipo de placas los pseudolisógenos son oscuros y las colonias libres de P22 son claras. La diferencia de color es debida a la existencia de lisis en las colonias de pseudolisógenos. Dicha lisis acidifica la colonia y hace virar el compuesto indicador. Generalmente, se necesitan dos o tres siembras sucesivas en placas verdes, o EBU, para detectar aislados libres de fago. Dichos aislados se forman por segregación espontánea de células libres de profago. Se considera que un transductante está "limpio" cuando en el aislamiento correspondiente no aparece ninguna colonia de color verde oscuro (Maloy, 1996).

● Ensayo de sensibilidad a P22

En las placas EBU, los aislados de color claro pueden ser lisógenos en los que no se está produciendo lisis. Estos aislados son resistentes a P22 y pueden ser confundidos con aislados libres de fagos. Esto hace aconsejable disponer de un ensayo adicional para determinar si una estirpe es sensible a P22. Con este objetivo se usa el mutante virulento H5. Sobre una placa de LB o EBU se extiende una estría de un lisado de H5 y se deja secar. Posteriormente, se cruzan perpendicularmente a la estría de H5 estrías de las estirpes a ensayar. Las estirpes sensibles sólo presentarán crecimiento hasta la estría de H5, mientras que las resistentes crecerán cruzando la estría (Maloy, 1996).

Transfección de células HeLa

En este estudio se han realizado transfecciones transitorias, cuando interesaba comprobar la expresión de SseK1 desde el vector pBABE-puro y transfecciones estables, cuando interesaba estudiar el efecto de la expresión de SseK1 en la célula de mamífero a medio o largo plazo.

● Transfección transitoria

Se utilizaron cultivos celulares subconfluentes, obtenidos generalmente en placas de 15 cm de diámetro, ya que se precisan varios millones de células por cada transfección. Las células se despegaron con tripsina, se contaron en un hemocitómetro, se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en medio de electroporación (DMEM suplementado con 15 mM de HEPES pH 7.4) a una concentración de 10^7 células por cada 200 μ l.

El ADN empleado (pBABE-puro y pBABE-puro-SseK1-3xFLAG) se preparó mediante columnas *Pure Yield™ Plasmid Midiprep System* de Promega. Cinco μ g de este ADN se llevaron a 50 μ l de volumen final con H_2O y NaCl a una concentración de 200 mM. A este ADN se le añadieron 200 μ l de las células resuspendidas en medio de electroporación y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación (con distancia entre placas de 4 mm).

Para la electroporación se emplearon las siguientes condiciones: 950 μ F, 720 Ω y 240 V. Tras la electroporación, las células se transfirieron a un tubo con 10 ml de medio de electroporación, se recogieron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, se resuspendieron en medio fresco (con HEPES) y se cultivaron durante 24 h, momento en que se suele alcanzar la máxima expresión de los ADN transfectados.

● **Transfección estable**

Para las transfecciones estables se usó también el vector pBABE-puro ([Morgenstern & Land, 1990](#)), que contiene un gen que confiere resistencia al antibiótico puromicina, el cual es un inhibidor de la síntesis de proteínas. El protocolo inicial de transfección es el mismo que el del apartado anterior. Entre 24 y 48 h tras la transfección, se despegaron las células, se diluyeron en medio DMEM suplementado con 1 μ g/ml de puromicina (InvivoGen) y se transfirieron a una placa de 24 pocillos de manera que hubiera inicialmente 10^5 células en algunos pocillos, 10^4 células en otros, y 10^3 células en los últimos. Como control, se llevaron también diluciones similares de células que no habían sido transfectadas. Periódicamente se refrescó el medio, siempre suplementado con puromicina, hasta que se observó la muerte de la mayoría de las células en el experimento y de todas las células control. Los clones aislados de células resistentes se transfirieron a placas de 6 pocillos y luego a placas de 10 y 15 cm de diámetro, hasta obtener suficientes células para comenzar los análisis de expresión y fenotípicos y para la congelación.

Construcción de estirpes bacterianas

Habitualmente, los marcadores genéticos se transfirieron de una estirpe a otra por transducción. Se transdujo la estirpe receptora con un lisado de P22 obtenido sobre una estirpe con el marcador deseado. Dado que todos los marcadores usados eran seleccionables, la transducción se sembraba directamente en medio selectivo. Por ejemplo, para seleccionar la transducción de una mutación Δ seK1::Km^r, la mezcla de transducción se sembró en medio con Km. Siempre que era posible se comprobaba que el transductante presentara la nueva mutación mediante PCR o mediante análisis fenotípico.

Cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación y secuenciación fueron sintetizados por Invitrogen o Stab Vida. Se muestran en la **Tabla M.5**.

Tabla M.5: Oligonucleótidos empleados en esta tesis. Las dianas de restricción están subrayadas.

Cebadores usados	Secuencia 5'-3'
Deleción de SPI1	
SPI1P1	AGCATAACGGCATTGTTATCGAATCGCTCATAAAGCGTT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI1P2	TATAAGGCTTGCAGTCTTTCATGGGCAGCAAGTAACGTC TCATATGAATATCCTCCTTAG
Deleción de SPI2	
SPI2P1	ATGTCTGAGGAGGGATTTCATGCTGGCAGTTTTAAAAGG CAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
SPI2P2	GGTGTTCGGTAGAATGCGCATAATCTATCTTCATCACCA CATATGAATATCCTCCTTAG
Construcción de pIZ1907	
pipb2bampsif5'	GAATGGATCCAGGAGGACAGCTATGGAGCGTTCACCTCG ATAG
pipb2bampsif3'	GAATGGATCCAAATATTTTCACTATAAAATTC
Construcción de pIZ1908	
pipb2_11bampsif5'	GAATGGATCCAGGAGGAAATATATGGCTAAATCTGCTTT TGG
pipb2bampsif3'	Como anteriormente
Construcción de pIZ1911	
pipb2bampsif5'	Como anteriormente
pipB2_10bampsif3'	CAAGGGATCCAACCCAGCCAGACTATCGAGTGAAC
Construcción de pIZ1913	

Materiales y Métodos

pipb2bampsif5'	Como anteriormente
pipB2_48bampsif3'	CACAGGATCCACCGACGTATCCCACCACAGGTAAAAA G
Construcción de pIZ1947	
pipb2bampsif5'	Como anteriormente
pipB2_100bampsif3'	GAATGGATCCATTCGTTATTCTCACCAGGAAG
Construcción de pIZ1948	
pipb2bampsif5'	Como anteriormente
pipB2_225bampsif3'	GAATGGATCCAATCGAGGGTAGCGCCACACATAATG
ST-PCR	
cya1	GAATGGGGGTTGACCAGGCGGAACATCAATGTGGC
cya2	CGGCGTTTGCCTAACCAGCC GGCCACGCGTCGACTAGTAC
st1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
stACGCC	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC
stGATAT	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNGATAT
Delección de <i>sseK1</i>	
sseK1dP1	TAAAATATGTAATGAAGTAAGTATGGAGCATTTAATTGTT GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
sseK1dP2	ATATTTTATGTATTCAATAGCATGATTATTGCCATTTCGC ATATGAATATCCTCCTTAG
Construcción de la fusión traduccional <i>sseK1::lacZ</i>	
sseK1P1b	CATGAACCTTTGCGTAACTGACTGGTATTCATT ATAATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
sseK1P4	ATATGTTCCCGCGCTTTCAAAAAATGAATTGGTTAAAC TATTCGGGGATCCGTCGACC
Etiquetado de <i>SseK1</i>	
sseK1P1flag	CAGTCAGTTTACGCAAAGTTCATGGGCGAGGCATGTGC AGGACTACAAAGACCATGACGG
sseK1P2flag	ATATTTTATGTATTCAATAGCATGATTATTGCCATTTCGC ATATGAATATCCTCCTTAG
Fusión cromosómica <i>sseK1::cyaA'</i>	
sseK1P1	CAGTCAGTTTACGCAAAGTTCATGGGCGAGGCATGTGC AGCTGCAGCAATCGCATCAGGC
sseK1P2	ATATTTTATGTATTCAATAGCATGATTATTGCCATTTCGT TAGAAAACTCATCGAGCATC
Verificación de la fusión cromosómica <i>sseK1::cyaA'</i>	
sseK1E1	TTAATTGCTCACTGGCAGGG
sseK1E2	GCACTGCGATTTTAAAGTGG
cyaArev	CCTTGATGCCATCGAGTACG
Construcción de pIZ1959	
sseK1BampSIFfw	AGTCGGATCCAGGAGGAAATAT ATGATCCCACCATTAATAG
sseK1BampSIFrev	GATCGGATCCACTGCACATG CCTCGCCCATG
Construcción de pIZ2095	
PsseK1-500fwBgl	AGTCAGATCTTTGGGACAATTACATTATG

PsseK1+40revXho	AGTCCTCGAGAACAATTAAATGCTCCATAC
Construcción de pIZ2115	
PsseK1-500fwEco	AGTCGAATTCCTGGGACAATTACATTATG
PsseK1+40revEco	AGTCGAATTCACAATTAAATGCTCCATAC
Construcción de pIZ2135	
sseK1TT-51CCfw	GCTTAGTTTAGCATCTTCCAGCTGACAGCGATTGC
sseK1TT-51CCrev	GCAATCGCTGTCAGCTGGAAGATGCTAAACTAAGC
Construcción de pIZ2136	
sseK1TT-62CCfw	CCTCCGGTTAATGCTTAGCCTAGCATC TTTTAGCTGAC
sseK1TT-62CCrev	GTCAGCTAAAAGATGCTAGGCTAAGCATT AACCGGAGG
Construcción de pIZ2112 y pIZ2137	
sseK1TT-73CCfw	GTATTTATGTATCCTCCGGCCAATGCTTAGT TTAGCATC
sseK1TT-73CCrev	GATGCTAAACTAAGCATTGGCCGGAGGATAC ATAAATAC
Construcción de pIZ2154	
sseK1-73TT-62CCfw	CCTCCGGCCAATGCTTAGCCTAGCATCTTT TAGCTGAC
sseK1-73TT-62CCrev	GTCAGCTAAAAGATGCTAGGCTAAGCATTGG CCGGAGG
Promotor sseK1	
FAMsseK1-500fw	TGGGACAATTACATTATGTTTG
FAMsseK1+40rev	AACAATTAAATGCTCCATACTTAC
FAMsseK1-300fw	CTCGCCATTATAAAATACCTG
FAMsseK1-1rev	CATGATGATTATTAGCACATG
Promotor slyB	
promslyBdir	AGACTTGCCTGTTGCGCAAC
promslyBrev	AAACGCTATTTTCAGCATCCC
Prootor <i>phoN</i>	
promphoNdir	AATGCGTGTCAGTCAGGCAC
promphoNrev	TTAGCTACGATCAGTGGTAG
Construcción de pIZ2047	
SseK1pBABE_5'	GTCAGGATCCGCCGCCACCATGATCCCACCATTAATAG
3FlagSal3'	CTGAGTCGACTTACTATTATCGTCGTCATC
Construcción de pIZ2203	
SseK1_pLex10_EcoR1fw	ATGCGAATTCATGATCCCACCATTAATAG
SseK1_pLex10_Sal1rev	ATGCGTCGACCTACTGCACATGCCTCGCCC
Secuenciación candidatos doble híbrido	
3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAG
Comprobación candidatos TBCB del doble híbrido	
TBCBfw	GCTCCTACCTGTAGATGACG
TBCBrev	CATATCTCGTCCAACCCGTAG
q RT-PCR	
ZNF267fw	AGGCACTGGGAGATTCTAG
ZNF267rev	CTACGGCCACATCCCTGA
STYXL1fw	GCCACATGTGTCACCTTCATTG

STYXL1rev	GCTGATACCTTGGGTGGA
PDE6Pfw	CCTGAGGGGCTTCAAATA
PDE6Prev	TCTTCTGTTCTTGCCAGAGT
IER2fw	TGTCAGTGGAAAGGCATAAGG
IER2rev	AGATTGGCCCAGTTTCACC
VIPR2fw	GCTCATCGAGTGATGGGAAC
VIPR2rev	CTTCACCAGAATATAAAACGTGATCT
Comprobación mutantes promotor <i>sseK1</i>	
sseK1TT-73CCrev	GATGCTAAACTAAGCATTGGCCGGAGGATACATAAATAC
sseK1TT-73CCfw	GTATTTATGTATCCTCCGGCCAATGCTTAGTTTAGCATC
sseK1TT-62CCrev	GTCAGCTAAAAGATGCTAGGCTAAGCATTAAACGGAGG
sseK1TT-62CCfw	CCTCCGGTTAATGCTTAGCCTAGCATCTTTTAGCTGAC
sseK1TT-51CCrev	GCAATCGCTGTCAGCTGGAAGATGCTAAACTAAGC
sseK1TT-51CCfw	GCTTAGTTTAGCATCTTCAGCTGACAGCGATTGC
sseK1AA2GGrev	CATACTTACTTCATTACATATTCCACATGATGATTATTAGC AC
sseK1AA2GGfw	GTGCTAATAATCATCATGTGGAATATGTAATGAAGTAAGT ATG
sseK1-73CCrev	GATGCTAAACTAAGCATTGG
sseK1-62CCrev	GTCAGCTAAAAGATGCTAGG
sseK1-51CCrev	GCAATCGCTGTCAGCTGG
sseK12GGrev	CTTACTTCATTACATATTCC

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En las reacciones de amplificación se usó un termociclador *T100 Thermal Cycler* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron con 1 ng de ADN, dNTP 300 μ M cada uno, cebadores 0.3 μ M, 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, y una concentración final de $MgCl_2$ de 1.5 mM en un volumen de 100 μ l. El programa térmico incluía los siguientes pasos: (i) desnaturalización inicial, 5 min a 95°C; (ii) 25 ciclos de desnaturalización (98°C, 20 s), alineamiento (55°C, 15 s), y extensión (72°C, 30 s/kb); e (iii) incubación final a 72°C durante 5 min para completar la extensión. Como enzima se usó la polimerasa *KAPA HiFi DNA polymerase*, suministrada por Kapa Biosystems.

Para la comprobación de algunos clones se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir de colonias, usando como enzima la polimerasa *MyTaqTM Red DNA polymerase*, suministrada por Bioline. En estos casos, se preparó una mezcla con 5 μ l del tampón de reacción proporcionado por la casa (dNTP 5 mM y $MgCl_2$ 15 mM), cebadores 0.2 μ M y 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, en

un volumen final de 25 µl. En esta mezcla se resuspendió poca biomasa procedente de una colonia. El programa térmico incluía los siguientes pasos: (i) desnaturalización inicial, 1 min a 95°C; (ii) 25 ciclos de desnaturalización (95°C, 15 s), alineamiento (55°C, 15 s), y extensión (72°C, 30 s/kb); e (iii) incubación final a 72°C durante 5 min para completar la extensión.

Antes de usar los productos de PCR, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y se limpiaron de proteína, oligonucleótidos y dNTP mediante un sistema comercial de purificación de bandas (*MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit*, suministrado por Intron biotechnology).

Semi-random, Two-step PCR (ST-PCR)

El protocolo de ST-PCR ([Chun et al., 1997](#)) se usó para amplificar las regiones genómicas adyacentes a las inserciones *cyaA'* aleatorias (**Figura M.1**). La primera reacción se llevó a cabo sobre las colonias bacterianas candidatas con los cebadores *cyaA1* y *stACGCC* o *stGATAT* (**Tabla M.5**) en un volumen final de 25 µl, usando un programa térmico con los pasos siguientes: (i) desnaturalización inicial, 2 min a 94°C; (ii) 6 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), apareamiento (42°C, 30 s, -1°C cada ciclo), y extensión (72°C, 3 min); (iii) 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), apareamiento (65°C, 30 s), y extensión (72°C, 3 min); e (iv) incubación final a 72°C durante 7 min para completar la extensión. La segunda reacción se llevó a cabo con los cebadores *cyaA2* y *st1*, usando 1 µl de una dilución 1:5 del producto de la primera reacción. El programa térmico de la segunda reacción fue: (i) desnaturalización inicial, 30 s a 94°C; (ii) 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 30 s), apareamiento (56°C, 30 s), y extensión (72°C, 2 min); e (iii) incubación final a 72°C durante 7 min para completar la extensión. Los productos finales se secuenciaron usando los cebadores *cyaA2* y *st1*.

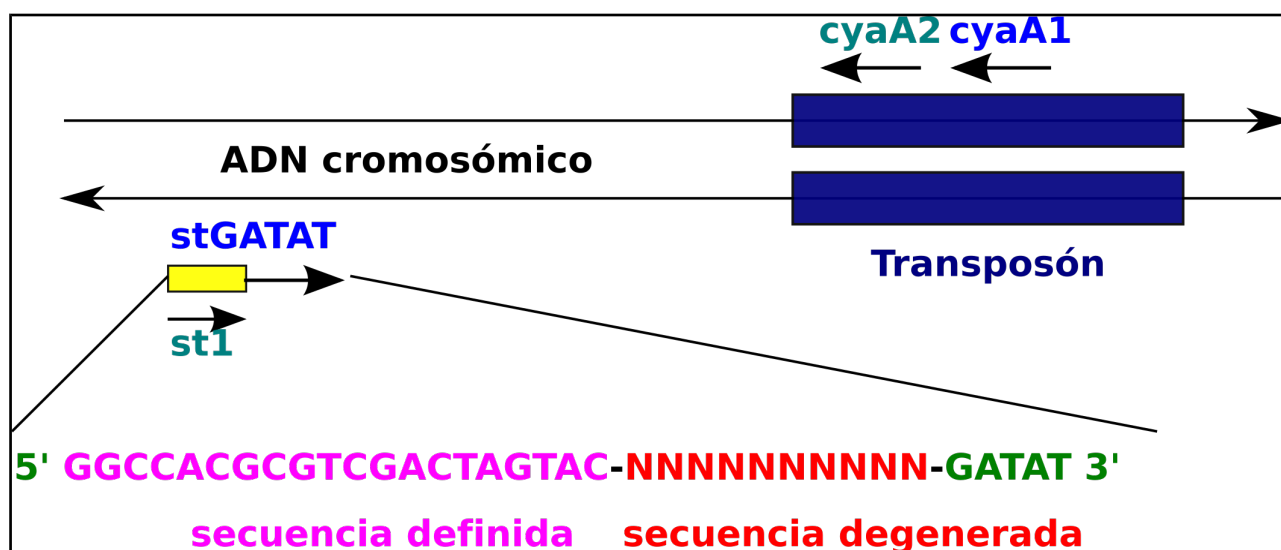


Figura M.1: Esquema explicativo del método ST-PCR. Las cinco últimas bases de la secuencia del oligonucleótido *st* permiten la hibridación del cebador cada cierto número de bases en el genoma de *Salmonella*. Se utilizaron dos cebadores de este tipo diferentes, uno terminado en GATAT y otro, en ACGCC, para ampliar la posibilidad de unión de la primera pareja de cebadores. Sabiendo que el genoma de *Salmonella* presenta un porcentaje en G+C del 52%, el oligonucleótido *stGATAT* se unirá cada 1159 pb ($1 / (0,26 \times 0,24 \times 0,24 \times 0,24 \times 0,24)$), y el oligonucleótido *stACGCC*, cada 912 pb ($1 / (0,24 \times 0,26 \times 0,26 \times 0,26 \times 0,26)$). Adaptado de (Chun *et al.*, 1997)

Mutagénesis dirigida

● Mutagénesis del promotor de *sseK1*

Se diseñaron los oligonucleótidos *sseK1TT-51CCfw* y *sseK1TT-51CCrev*, *sseK1TT-62CCfw* y *sseK1TT-62CCrev*, *sseK1TT-73CCfw* y *sseK1TT-73CCrev* y *sseK1-73TT-62CCfw* y *sseK1-73TT-62CCrev* (**Tabla M.5**), que contenían los nucleótidos que se querían cambiar para generar las mutaciones puntuales en el promotor de *sseK1* clonado en pIC552. Se usaron como cebadores para amplificar por PCR la nueva secuencia mutada de dicho promotor. Como molde de ADN para la PCR se usaron los plásmidos pIZ2095 [pIC552- *PsseK1*(-500/+40)] y pIZ2112 [pIC552- *PsseK1*(-500/+40)TT-73/-72CC]. El programa térmico incluyó los siguientes pasos: (i) desnaturalización inicial, 30 s a 95°C; (ii) 12 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), apareamiento (42°C, 1 min), y extensión (68°C, 5 min); e (iii) incubación final a 72°C durante 7 min para completar la extensión. El fragmento de ADN obtenido se trató con 1 µl de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/µl) durante 1 h a 37°C para eliminar los restos de ADN molde. Esta enzima corta ADN en la diana GATC sólo si este está metilado, lo cual ocurre en el caso del ADN molde pero no en el del ADN recién sintetizado en la PCR. Posteriormente se usó 1 µl de ADN tratado con *DpnI* para transformar la estirpe de *E. coli* DH5α. Se seleccionaron los transformantes en medio LB

suplementado con Ap. La introducción de las mutaciones puntuales se confirmó mediante secuenciación.

Inactivación de genes cromosómicos usando productos de PCR

Para la construcción de mutantes nulos se siguió el método descrito por Datsenko y Wanner ([Datsenko & Wanner, 2000](#)). Este procedimiento está basado en el sistema de recombinación Red del fago λ . Una de las razones por las que *E. coli* o *Salmonella* no son transformables con ADN lineal es la presencia de exonucleasas intracelulares que lo degradan. El sistema Red del fago λ incluye los genes γ , β y exo , que codifican las proteínas Gam, Bet y Exo, respectivamente. Gam inhibe la exonucleasa V del hospedador, permitiendo el acceso de Bet y Exo a los extremos de ADN para promover la recombinación. La estrategia básica consiste en reemplazar una secuencia cromosómica, por ejemplo el gen B de la **Figura M.2**, por un gen de resistencia a antibiótico seleccionable, el cual es generado por PCR usando cebadores que contienen 40 nucleótidos de homología con la secuencia colindante a la que queremos reemplazar (P1 y P2 en la **Figura M.2**). La recombinación la lleva a cabo el sistema Red del fago λ , expresado desde un promotor inducible por arabinosa en un plásmido de bajo número de copias y termosensible (pKD46). Tras la selección, el gen de resistencia puede eliminarse usando otro plásmido (pCP20), que expresa la recombinasa FLP (flipasa) del plásmido de 2 μ de *S. cerevisiae*. El sistema FLP actúa en las repeticiones directas FRT (*FLP recognition target*) que flanquean la secuencia. Los plásmidos que contienen los sistemas Red y FLP son termosensibles y pueden eliminarse fácilmente mediante cultivo a 37°C.

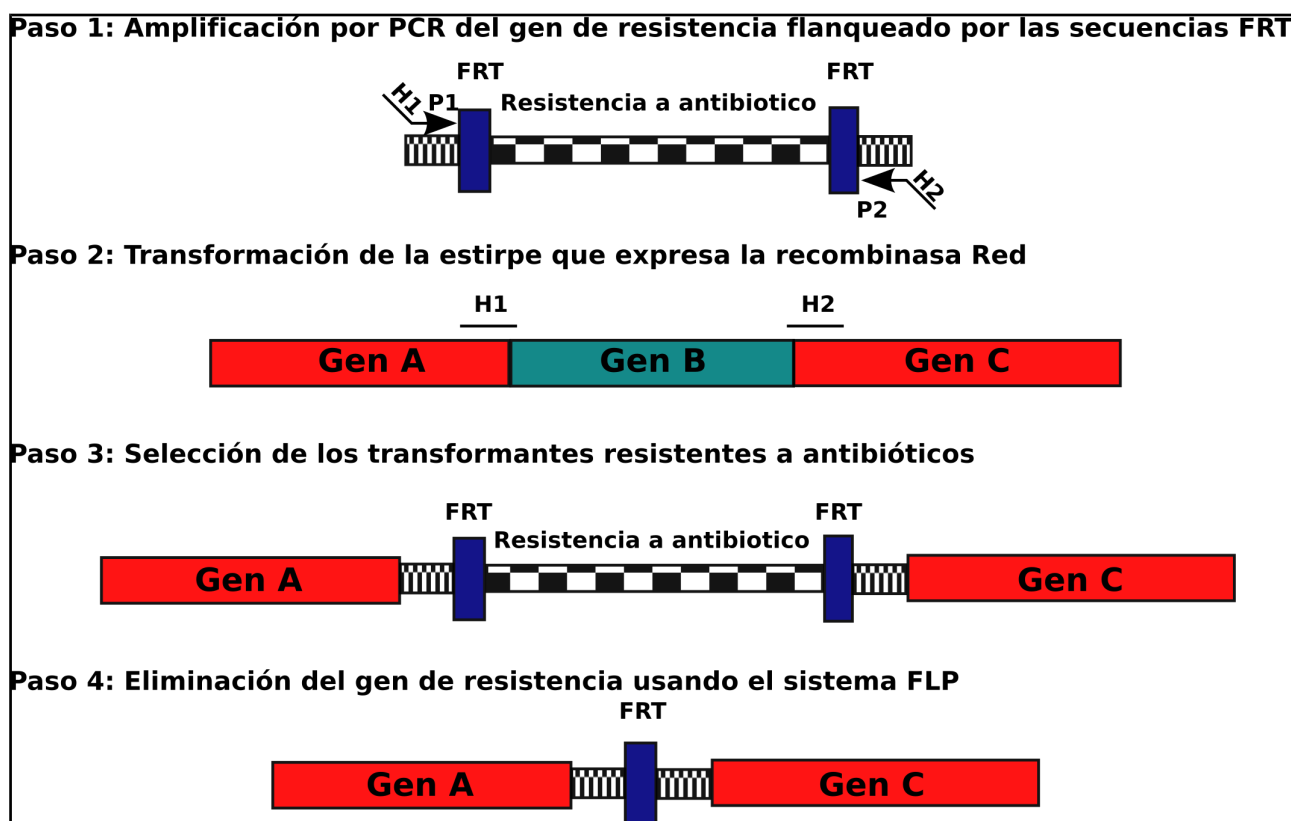


Figura M.2: Protocolo para eliminar regiones cromosómicas. Paso 1: Amplificación mediante PCR de los plásmidos pKD3 o pKD4. Paso 2: Transformación con el producto de la PCR y recombinación con la recombinasa Red de lambda. Paso 3: Selección de los transformantes con el antibiótico adecuado (cloranfenicol para pKD3 y kanamicina para pKD4). Paso 4: Eliminación de la resistencia usando un plásmido de expresión de FLP. Adaptado de (Datsenko & Wanner, 2000).

● Preparación del ADN para la sustitución

Los plásmidos usados como molde en las reacciones de PCR fueron pKD3 (Cm^r) o pKD4 (Km^r). Los cebadores tenían 40 nucleótidos de homología con el gen a inactivar y 20 nucleótidos de homología con pKD3 o pKD4. Los oligonucleótidos usados para la construcción de los distintos mutantes se relacionan en la **Tabla M.5**. El producto de PCR de las reacciones de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa y la banda obtenida se purificó mediante *MEGAquick-spin Total Fragment DNA Purification Kit*, suministrado por Intron biotechnology.

● Transformación de los receptores

Se prepararon células electrocompetentes de la estirpe receptora adecuada que llevaba el plásmido pKD46, el cual expresa el sistema λ Red bajo el control del promotor de *araB*, inducible por arabinosa, y se transformaron por electroporación con el ADN obtenido en la PCR anterior. Se

sembraron en medio selectivo hasta la obtención de colonias y se confirmó la mutación mediante PCR de colonias, usando cebadores externos a la región sustituida.

- **Escisión del gen de resistencia a antibiótico**

Una vez sustituidos los genes de interés, las mutaciones se introdujeron en los fondos genéticos apropiados mediante transducción con P22 y selección de la resistencia al antibiótico correspondiente. Posteriormente, cuando fue necesario, el gen de resistencia se escindió transduciendo el plásmido pCP20 con P22 HT (**Figura M.2**). La transducción se incubó durante 1 h a 30°C y se sembró en LB con Ap. Para eliminar el plásmido pCP20, las limpiezas de fagos se llevaron a cabo en placas EBU sin antibiótico, cultivadas a 37°C. Una vez que los candidatos estuvieron limpios de fagos, la pérdida de la resistencia a antibiótico se comprobó sembrando en placas de LB con Ap y LB con Cm o Km, según corresponda, además de por PCR con los cebadores externos.

Construcción de fusiones *lac*

- **Fusiones cromosómicas**

Para la construcción de las fusiones transcripcionales y traduccionales en el cromosoma se siguió el método descrito por Ellermeier y colaboradores ([Ellermeier et al., 2002](#)). Dicho método permite la construcción de fusiones *lac* estables utilizando el sistema de recombinación específica de sitio FLP/FRT.

Como se explicó en el apartado anterior, se puede insertar un gen de resistencia a antibiótico en cualquier punto del cromosoma bacteriano ([Datsenko & Wanner, 2000](#)). Dado que la inserción está flanqueada por sitios FRT, el gen de resistencia puede escindirse introduciendo el plásmido pCP20, que codifica el sistema FLP. El resultado de la delección es una "cicatriz" en el punto de inserción que consiste en un sitio único FRT con determinada orientación (**Figura M.2** y **Figura M.3**). Este sitio FRT puede usarse para la integración de un plásmido pCE que contiene un sitio FRT aguas arriba de los genes *lacZY*, generando así una fusión *lac*. La recombinación específica de sitio mediada por el sistema FLP es un evento direccional.

Existen dos plásmidos, pCE36 y pCE37, para la creación de fusiones transcripcionales *lac*, que difieren en la orientación del sitio FRT, y un plásmido, pCE40, para la creación de fusiones traducionales *lac*, al cual le falta el sitio de inicio de la transcripción de *lacZ* y tiene codones de STOP en todos los marcos de lectura excepto en uno de ellos. Estos plásmidos, además, contienen un gen de resistencia a Km y el origen de replicación R6K, que únicamente es activo cuando se proporciona en *trans* la proteína pi (π), codificada por el gen *pir*. La elección del plásmido depende de la orientación del sitio FRT en la mutación original (**Figura M.3**).

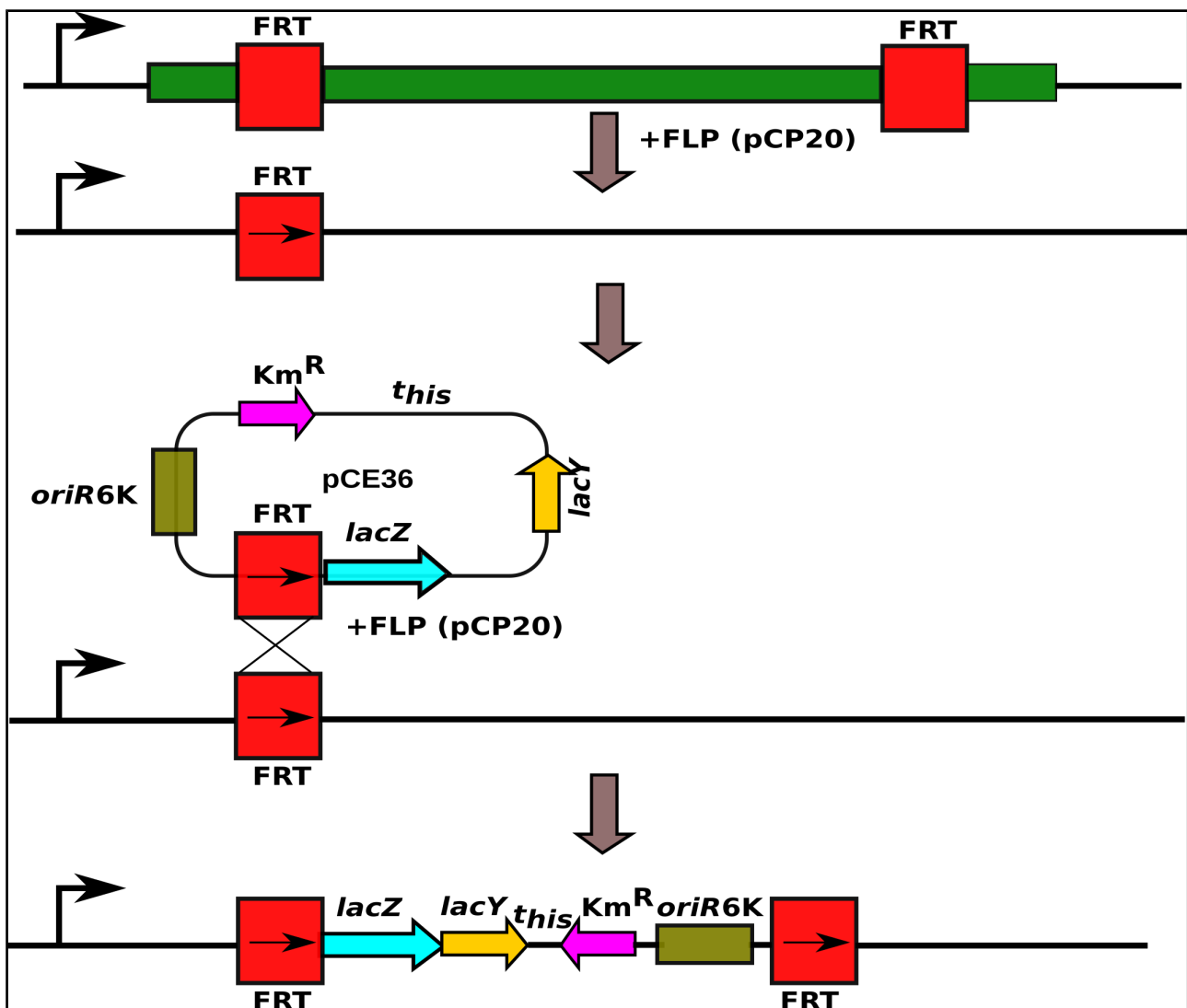


Figura M.3: Esquema de la construcción de fusiones *lac* en el cromosoma. En este caso se muestra la construcción de una fusión transcripcional *lac* con el plásmido pCE36 [adaptado de (Ellemeier *et al.*, 2002)].

● Fusiones plasmídicas

El vector pIC552 permite la construcción *in vitro* de fusiones transcripcionales al gen *lacZ*, que se expresa desde las señales de inicio de la traducción de *galK* (Macián *et al.*, 1994). El sitio de

unión a ribosomas (RBS) de *galK* y su región previa natural aseguran una eficiencia constante para la traducción de *lacZ* y, así, la producción de β -galactosidasa de una fusión dada es directamente proporcional a la actividad transcripcional in vivo del fragmento de ADN insertado. De esta forma, se clonaron en pIC552 diferentes fragmentos del promotor de *SseK1*, amplificados previamente por PCR con los cebadores indicados en la **Tabla M.5**, los cuales permitieron añadir las dianas de restricción de las enzimas *Bgl*II y *Xho*I a los extremos de dichos fragmentos para su posterior ligación al vector previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Estas construcciones se usaron para la transformación de células electrocompetentes de diferentes estirpes de *E. coli* y *S. enterica*.

Construcción de fusiones 3xFLAG

Para etiquetar proteínas con el epítipo 3xFLAG se siguió el método descrito en (Uzzau *et al.*, 2001), una modificación del método de Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). El objetivo es manipular una secuencia cromosómica, la secuencia del gen que codifica la proteína que queremos etiquetar, añadiéndole un fragmento de ADN que contiene una secuencia que especifica un epítipo (3xFLAG) y una resistencia a antibiótico (Km). La construcción se genera mediante PCR y transformación (estrategia esquematizada en la **Figura M.4**). Uno de los oligonucleótidos usados en la amplificación contiene una secuencia de unas 40 bases que se corresponde con los últimos nucleótidos de la parte codificante del gen que se quiere etiquetar, sin incluir el codón de parada. El otro, denominado P2, contiene una secuencia de unas 40 bases idéntica a la secuencia que está a continuación de dicho codón de parada, pero en la cadena complementaria. El plásmido empleado como molde para la PCR se llama pSUB11 (**Tabla M.4**) y contiene la secuencia del epítipo FLAG, repetida tres veces, junto a un gen de resistencia a Km. El producto de la PCR se emplea para transformar una estirpe de *Salmonella* portadora del plásmido pKD46, que expresa el sistema λ Red bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Esta recombinasa es necesaria para que se produzca la recombinación entre el fragmento de PCR y el cromosoma bacteriano. El plásmido pKD46 es termosensible y porta un gen de resistencia a Ap, por lo que el mantenimiento del mismo requiere que las bacterias se cultiven a 30°C en presencia de Ap y, además, la expresión de la recombinasa Red requiere la adición de arabinosa al medio. La correcta incorporación del fragmento amplificado se comprobó por PCR, con una pareja de oligonucleótidos externos, y por *western blot*, usando anticuerpos monoclonales anti-FLAG.

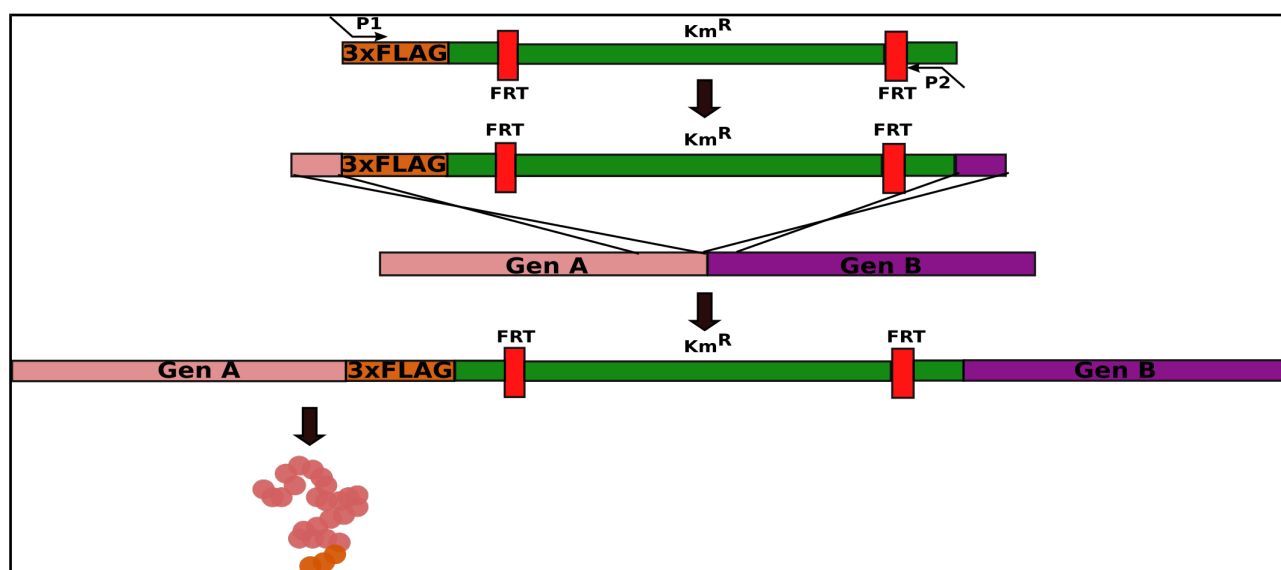


Figura M.4: Construcción de proteínas de fusión con el epítipo 3xFLAG. Se amplifica un fragmento de ADN, que comienza con la secuencia codificadora del epítipo y que incluye un gen de resistencia a antibiótico flanqueado por sitios FRT, con oligonucleótidos que presentan secuencia homóloga (36-40 pb) a la región inmediatamente precedente al codón de parada de la traducción del gen diana y a una región aguas abajo de ésta. El fragmento amplificado se introduce en una estirpe que expresa el operón red del bacteriófago λ y se seleccionan los recombinantes resistentes a antibiótico. La bacteria recombinante sintetiza la proteína diana con el epítipo fusionado a su extremo C-terminal [adaptado de (Uzzau *et al.*, 2001)].

El gen de resistencia a antibiótico se puede eliminar mediante la recombinasa FLP, permitiendo así la repetición del procedimiento descrito arriba para etiquetar otro gen diana.

Construcción de fusiones CyaA'

● Fusiones plasmídicas

Los plásmidos que expresan las fusiones CyaA' son derivados de pIZ1673, una modificación de pSIF003-R1 (Valinsky *et al.*, 2002) que se construyó por delección del gen *lacI* usando las enzimas *HpaI* y *SphI*. Así, se consigue que la expresión de las fusiones CyaA' a partir de los derivados de pIZ1673 no sea dependiente de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). Para construir estos plásmidos, el ADN de la estirpe 14028 se usó como molde para la PCR con los oligonucleótidos recogidos en la Tabla M.4. Los fragmentos amplificados se digirieron con *BamHI* y se ligaron con pIZ1673 previamente cortado con *BamHI* y desfosforilado. Para detectar las construcciones apropiadas (plásmido con el inserto en la orientación correcta), la mezcla de ligación se utilizó para transformar la estirpe de *E. coli* TP610 y los transformantes se seleccionaron en agar MacConkey

sin lactosa y suplementado con Ap y con 1% de maltosa. La estirpe TP610 es un mutante *cya* (Glaser *et al.*, 1988) que puede ser complementado con la actividad basal adenilato ciclasa que posee CyaA de *B. pertussis* en ausencia de calmodulina. Debido al hecho de que *cya* en pIZ1673 no presenta un sitio de unión a ribosomas, los transformantes con vectores vacíos o con insertos en la orientación incorrecta producirán colonias blancas en MacConkey-maltosa, mientras que los plásmidos con insertos en la orientación correcta producirán colonias rojas en dicho medio.

● Fusiones cromosómicas aleatorias:

Para la generación de fusiones *cyaA'* se siguió el método descrito por Tu en 2001 (Tu *et al.*, 2001). El método consiste en la mutagenesis aleatoria con mini-Tn5*cyaA'* mediante la conjugación de la estirpe donante de *E. coli* S17-1 λ pir con las estirpes receptoras de *S. enterica* 14028 SV5030 y SV6151. Las estirpes receptoras se incubaron 30 min a 50°C, antes de la conjugación, con el fin de inactivar temporalmente el sistema de restricción y aumentar la frecuencia de conjugación. Alícuotas de 500 μ l del receptor y del donador se recogieron por centrifugación, se mezclaron en filtros de membrana de 45 μ m de diámetro de poro que se colocaron sobre placas de medio mínimo E-glucosa agar y se incubaron a 37°C durante 4 h. Después del apareamiento, las mezclas se suspendieron en MgSO₄ 10 mM y se extendieron sobre agar LB con Km. Los conjugantes se reunieron en colecciones de 100 conjugantes, y se probaron en infecciones de cultivos celulares para averiguar si provocaban un aumento en los niveles de AMPc del cultivo, lo que sería indicio de translocación de la fusión y activación de CyaA' dependiente de calmodulina. Los candidatos positivos se analizaron mediante stPCR y secuenciación para conocer en qué efector estaba la fusión.

● Fusiones cromosómicas dirigidas:

Para la generación de fusiones *cyaA'* en el cromosoma de manera dirigida se siguió el método descrito en el capítulo 1 de esta tesis. Primero se amplificó un fragmento del plásmido pUTmini-Tn5*cyaA'* que contiene la secuencia de ADN que codifica el dominio catalítico de CyaA' de *B. pertussis* y un gen que confiere resistencia a Km. Se usaron los cebadores SseK1P1 y SseK1P2 (Tabla M6) para la amplificación de esta secuencia con la Kapa HiFi Taq. Se migró el producto de PCR en un gel de agarosa al 0,8% en TAE. Se visualizó la banda y se cortó para su purificación con un kit de purificación de bandas. El ADN purificado se resuspendió en 40 μ l de agua destilada y una parte se empleó para transformar la estirpe de *S. enterica* 14028/pKD46 mediante

electroporación. Se sembró la transformación en medio selectivo con Km y se incubaron las placas de transformación a 37°C hasta el día siguiente que se recogieron colonias para picar en nuevas placas de LB+Km y para realizar PCR de comprobación con los oligos sseK1E1, sseK1E2 y sseK1E1, cyaArev. Una vez confirmada la transformación se hicieron lisados para transducir la fusión por transducción con el fago P22. Las estirpes reconstruidas con el fago P22 se sometieron al ensayo de sensibilidad de H5 para comprobar que no había lisogenia.

Secuenciación

Los ADN plasmídicos y cromosómicos amplificados por PCR se secuenciaron en el secuenciador automático de ADN de Stab Vida (Oeiras, Portugal).

Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de secuencias de nucleótidos se realizó empleando algoritmos de biología molecular del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) en www.ncbi.nlm.nih.gov y del *European Bioinformatics Institute* (EBI) en www.ebi.ac.uk. Para identificar el sitio de inicio de la transcripción de *SseK1*, se usó la información proporcionada en el sitio web <http://bioinf.gen.tcd.ie/jbrowse/SL1344/> (Kröger *et al.*, 2012), donde están descritos la mayoría de los +1 de *Salmonella* en la estirpe SL1344.

MANIPULACIÓN DEL ARN

Extracción de ARN con TRIzol®

Este método es una modificación del protocolo de extracción con *TRIzol® Reagent* suministrado por Invitrogen Life Technology.

- **Extracción de ARN eucariota**

Para la obtención del ARN total de células HeLa se realizaron tres extracciones independientes para cada línea celular. Partiendo de cultivos confluentes en pocillos de placas de 6 pocillos, se

retiró el medio y se añadió directamente, sin lavar para evitar pasos de posible degradación de ARN, 1 ml de *TRIzol*® y se pipeteó bien la muestra en el mismo pocillo para conseguir la lisis celular. El homogeneizado se congeló a -80°C (puede permanecer así durante, al menos, un mes), tras lo cual se descongeló, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se continuó con el protocolo de extracción. Se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 10 min, se recogieron los sobrenadantes volcándolos en tubos limpios (para eliminar el ADN genómico) y se añadieron 200 µl de cloroformo. Se mezcló en el agitador de vórtice durante 15 s y se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 15 min. Se recogieron los sobrenadantes, con cuidado de no recoger la interfase, y se pasaron a tubos limpios, a los cuales se les añadió el mismo volumen (unos 500 µl) de isopropanol. Se mezcló bien, invirtiendo los tubos 2-3 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Se centrifugó a 13000 rpm en frío durante 10 min, se decantaron los sobrenadantes y se lavaron los precipitados con etanol frío al 70%. Se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes y se dejaron secar los precipitados. Dichos precipitados se guardaron a -20°C hasta el momento de su uso, cuando se resuspendieron en 30 µl de H₂O libre de ARNasas (H₂Odd autoclavada es suficiente). En los casos en los que quedó una suspensión gelatinosa, se incubó a 65°C durante unos minutos hasta obtener una mezcla fácilmente pipeteable y homogénea.

Fenolización del ARN

En los casos en los que las muestras de ARN no estaban lo suficientemente limpias como para no generar errores en los ensayos siguientes se procedió a la fenolización de las mismas. El ARN disuelto en H₂Odd obtenido en la extracción se llevó, añadiendo más H₂Odd, hasta un volumen final de 150 µl. Se añadió el mismo volumen de fenol y se mezcló en un agitador de vórtice. Se centrifugó en frío durante 5 min a 13000 rpm y se recogió la fase superior, la cual se pasó a un tubo limpio. Se añadió el mismo volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), se mezcló en el agitador de vórtice y se centrifugó de nuevo en frío a 13000 rpm durante 5 min. La fase superior se pasó a un tubo nuevo y se añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1:10 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2. Se dejó precipitando a -20°C durante 30 min o más, se centrifugó en frío a 13000 rpm durante 30 min y se lavó con etanol al 70%. A partir de aquí, se siguieron los mismos pasos que en el protocolo de extracción de ARN.

Limpieza del ARN mediante kit comercial

Por recomendación del servicio que realizó el análisis por *microarray*, tras la extracción del ARN se añadió un paso de limpieza mediante el kit comercial *RNeasy MinElute Cleanup Kit*, suministrado por Qiagen, tal y como indican las instrucciones del fabricante.

qRT-PCR

2-4 µg de ARN total procedente de células HeLa se usó como molde por cada 20 µl de mezcla de reacción de transcripción inversa con retrotranscriptasa *Quantiscript* (Qiagen) y un cebador de ADN apropiado, usando el tampón y el protocolo suplementados por el fabricante. Se incluyeron controles negativos sin enzima para cada muestra o pareja de oligonucleótidos usados. Se utilizaron 4 µl de cada retrotranscripción como molde para la PCR con los oligonucleótidos indicados en la **Tabla M.5** [los oligonucleótidos se diseñaron con el *software Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche)]. La qRT-PCR se llevó a cabo en un *LightCycler 480 II* (Roche) con *SYBR Premix Ex Taq* (Takara) en un volumen total de 10 µl sobre una placa de reacción óptica de 384 pocillos (Applied Biosystems®), usando el protocolo para el *LightCycler*. Las condiciones fueron: (i) 95°C, 10 s; (ii) 40 ciclos a 95°C, 5 s y 60°C, 20 s, (iii) 95°C, 1 s, 65°C, 0 s y 95°C, 1 s. El análisis de las curvas de fusión verificó que cada mezcla de reacción contenía un único producto de PCR. Los niveles de expresión génica de los genes eucariotas regulados por SseK1 en las qRT-PCR realizadas sobre las células HeLa se normalizaron a los transcritos de VIPR2, gen que apareció como uno de los genes no afectados por la presencia de SseK1 en el análisis de *microarray*.

● Cuantificación de los resultados

En este trabajo se realizó una cuantificación relativa del ARNm correspondiente a los genes de estudio mediante el método denominado " $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ". Este método consiste en la comparación de los valores C_t (ciclo en el cual la emisión de fluorescencia por parte del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo) del gen de estudio y del gen de referencia, o *housekeeping*, en cada muestra (valor ΔC_t^{26}). Posteriormente se comparan los valores ΔC_t s de la muestra experimental respecto a la muestra control ($\Delta\Delta C_t^{27}$). Finalmente, el valor $2^{-\Delta\Delta C_t}$ expresa las veces de cambio en la expresión del gen de estudio en la muestra experimental con respecto a la muestra control.

²⁶ ΔC_t : C_t gen de estudio - C_t gen de referencia.

²⁷ $\Delta\Delta C_t$: ΔC_t muestra - ΔC_t control

Análisis de la expresión génica por *microarray*

El estudio de perfiles de expresión génica en HeLa pBABE-puro-SseK1-3xFLAG se realizó en la Unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Se utilizaron los *microarrays GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* (Affymetrix), que contienen 26 sondas diseñadas a lo largo de cada gen y representan un total de 28869 genes humanos. Esto permite realizar estudios de expresión diferencial muy completos, ya que incluye el análisis de transcritos estándar (poliadenilados en el extremo 3'), transcritos con región 3' no definida, ARNm con sitios de poliadenilación alternativos o no poliadenilados, transcritos truncados, ARN degradados, transcritos de deleciones genómicas, procesamientos alternativos y transcritos con extremos 5' alternativos.

Para llevar a cabo este análisis se extrajo ARN de tres cultivos independientes de cada una de las líneas de interés derivadas de células HeLa. La cuantificación y la determinación de la integridad del ARN aislado se analizó mediante el *Bionalyzer 2100* (Agilent). Tras el control de calidad de las muestras de ARN total, se sintetizó, amplificó, purificó y marcó con biotina el ADNc correspondiente. Posteriormente, se realizó la hibridación de los *arrays*, revelado, lavado y lectura de la señal con el *Scanner 3000 7G* (Affymetrix). El control de calidad del proceso de síntesis y marcaje del ADNc, así como el de la hibridación, reveló que el protocolo experimental transcurrió de forma óptima.

Tras este protocolo se procedió al análisis bioestadístico, que consta principalmente de dos pasos: normalización por RMA (*robust microarray average*) y análisis de la varianza de los datos obtenidos, con el fin de determinar si las diferencias entre los dos grupos eran o no significativas.

● Análisis de ontología génica

El análisis de ontología génica (GO, *Gene Ontology*) se basa en la descripción de los atributos funcionales de un producto génico según tres categorías: función molecular, proceso biológico y componente celular (The GO Consortium, 2006). Los datos para los genes de interés se obtuvieron de la base de datos Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) y de las herramientas de AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo/>) (Carbon *et al.*, 2009). Por su parte, el programa GeneMANIA (Mostafavi *et al.*, 2008; Zuberi *et al.*, 2013) permitió identificar las conexiones entre los genes con expresión diferencial.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Preparación de extractos proteicos

- **Extractos bacterianos para análisis en gel de poliacrilamida**

Tras el cultivo bacteriano en las condiciones necesarias para cada experimento, se tomó el volumen deseado y se centrifugó a 13000 rpm durante 5-10 min. Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en un volumen determinado de tampón de Laemmli²⁸, se hirvió a 95°C durante 5 min, se centrifugó a 13000 rpm varios segundos y el sobrenadante se cargó en el gel de electroforesis.

- **Extractos de células eucariotas para análisis en gel de poliacrilamida**

Se recogieron las células por tripsinización y se contaron, usando una cámara de Neubauer. Se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm y se lavaron dos veces con PBS. El sedimento de células se incubó en hielo con tampón de lisis NP40²⁹ o tampón de lisis Tritón X-100³⁰, junto con PMSF³¹ 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas 1:100 (Sigma-Aldrich), durante 20 min. Tras la lisis, el extracto se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm y el sobrenadante se recogió en un tubo nuevo, donde se añadió el volumen correspondiente de tampón de Laemmli. Se hirvió y se cargó en el gel de electroforesis. En el caso de extractos para análisis proteómico en geles bidimensionales, no se hirvieron las muestras en tampón de Laemmli.

²⁸ **Tampón de Laemmli para la muestra (SB 4x):** azul de bromofenol 0.000125%, Tris-HCl pH 6.8 200 mM, β -mercaptoetanol 20%, glicerol 40% y SDS 8%.

²⁹ **Tampón de lisis NP40:** Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerol 10%, NP40 1%.

³⁰ **Tampón de lisis Tritón X-100:** Tris-HCl 25 mM pH7.5, NaCl 100 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 0.1-1%.

³¹ **PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro):** 0.1 M en etanol absoluto.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas se separaron por su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido por SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) y descrito originalmente en (Laemmli, 1970). En un sistema vertical *Mini Protean® III* (Bio-Rad) se empaquetaron primero las muestras en un gel de empaquetamiento³² de 1 cm de longitud, para separarse a continuación en un gel de separación³³ de unos 5 cm de longitud. Se usaron geles de separación al 10 o 12 % de acrilamida (o geles de gradiente 4-15%, *Mini-PROTEAN TGX Precast Gels*, Bio-Rad), según el tamaño de las proteínas que se querían separar, con un gel de empaquetamiento al 4%. La electroforesis se realizó en tampón de migración³⁴, aplicando un campo eléctrico de 175 V durante 45-60 min.

● Marcadores de peso molecular

Como patrón de peso molecular se utilizaron dos tipos de marcadores comerciales: *SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* o *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range*, Laboratorios Bio-Rad.

Tinción de geles con azul de Coomassie

Para teñir un gel proveniente de SDS-PAGE, se utilizó el colorante *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich). Para ello, se bañó el gel en solución de tinción³⁵ durante 30 min. A continuación, se retiró dicha solución, se lavó con H₂O y se añadió solución de destinción³⁶, manteniéndose sumergido el gel en ella hasta la correcta visualización de las bandas correspondientes a las proteínas.

Inmunodetección de proteínas mediante western blot

● Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

³² **Gel de empaquetamiento:** Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida 4% (Solu Gel 29:1 Ultra Pura, Pronadisa), TEMED 0,1% (v/v), persulfato amónico 0,1 % (p/v).

³³ **Gel de separación:** Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida 10-12%, TEMED 0,04% (v/v), persulfato amónico 0,1% (p/v).

³⁴ **Tampón de migración:** Tris 3,03 g/l, glicina 14,41 g/l, SDS 1 g/l.

³⁵ **Solución de tinción:** *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25% (p/v), ácido acético 10 % (v/v) y etanol 10% (v/v).

³⁶ **Solución de destinción:** ácido acético 10 % (v/v) y etanol 40% (v/v).

Las proteínas, sometidas a SDS-PAGE, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (*Amersham Hybond-ECL*, GE Healthcare) usando un sistema de transferencia semiseca (*Trans-Blot Turbo Transfer System*, Bio-Rad). El gel se equilibró durante 10 min en tampón de transferencia, se puso en contacto con la membrana de nitrocelulosa y el conjunto se rodeó con papel Whatman 3MM, impregnado todo en tampón de transferencia³⁷ 1x. Se introdujo en el aparato de transferencia y se siguieron las instrucciones del fabricante.

● Tinción con Ponceau

Después de la transferencia, la membrana se lavó 2 veces con H₂O y se tiñó con una solución de rojo Ponceau³⁸ durante 5 min. Se lavó de nuevo con agua hasta la aparición de bandas. Esto nos permitía tener un control de carga en todos los carriles o detectar la presencia o ausencia de proteína en el extracto.

● Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa

Previamente a la incubación con los anticuerpos, la membrana de nitrocelulosa se saturó con tampón de bloqueo³⁹ durante, al menos, 30 min a temperatura ambiente en agitación suave, o toda la noche a 4°C.

● Incubación con el anticuerpo primario

Tras el bloqueo se añadió el anticuerpo primario, diluido adecuadamente en tampón de bloqueo, y se incubó 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados en este estudio se presentan en la **Tabla M.6**.

● Incubación con el anticuerpo secundario

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con tampón TBS-Tween y, posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla M.6**) diluido en TBS-Tween durante 1 h en agitación suave a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios están conjugados a la enzima peroxidasa (HRP). Tras este paso, se lavó nuevamente con TBS-Tween (6 lavados de 5 min cada lavado).

³⁷ **Tampón de transferencia 10x:** Trizma base 58,2 g/l y glicina 29,3 g/l. El tampón de transferencia 1x lleva, además, 20% de metanol y 0,04 % de SDS.

³⁸ **Solución de rojo Ponceau S:** 0,5 % (p/v) del colorante en 5 % de ácido acético.

³⁹ **Tampón de bloqueo:** leche desnatada en polvo (Difco) 5% (p/v) y azida sódica 0,02% en TBSTween 1x.

TBS-Tween 10x: Trizma base 24,2 g/l, NaCl 80 g, Tween-20 10 ml. Ajustar a pH 7,6.

Tabla M.6: Anticuerpos empleados para la detección de proteínas. WB: western blot; IP: inmunoprecipitación; HRP: *horseradish peroxidase*.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Casa comercial	Uso/ dilución
Anti-Flag M2	Primario, monoclonal	ratón	Sigma	WB 1:5000
Anti-GroEL	Primario, policlonal	conejo	Sigma	WB 1:10000
Anti-DnaK (8E2/2)	Primario, monoclonal	ratón	Assay Designs	WB 1:5000-1:10000
Anti-CyaA (3D1)	Primario, monoclonal	ratón	Santa Cruz Biotechnology	WB 1:1000

● Detección de la señal

Finalmente, se realizó la reacción de detección usando el *SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Pierce Biotechnology, Inc.), un sustrato muy sensible para la reacción llevada a cabo por la HRP. Las imágenes se adquirieron usando un sistema Fujifilm LAS3000 mini o mediante películas de rayos X (*CL-Xposure™ Film*, Thermo Scientific), y la cuantificación se realizó con el software *ImageJ*.

Fosforilación de la His₆-PhoP

Para el ensayo de unión de la proteína al promotor de *SseK1* (y a los promotores control), la His₆-PhoP se fosforiló con acetilfosfato como se describió previamente ([Tang et al., 2012](#)), con modificaciones. La proteína se incubó en tampón de fosforilación⁴⁰ durante 1 h a 37°C, tras lo cual se mantuvo en frío hasta el momento de su uso (unos minutos).

Estudio de la interacción ADN-proteína mediante ensayo de cambio en la movilidad electroforética

Los fragmentos de ADN usados para el ensayo de unión de PhoP se amplificaron por PCR usando *Salmonella* 14028 como molde o, en su caso, los plásmidos correspondientes derivados de pIC552. Los cebadores directo o reverso (**Tabla M.5**) se marcaron con el fluorocromo FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5'. La amplificación por PCR generó fragmentos de 281, 355 y 540 (o 300 pb) para los promotores de *phoN*, *slyB* y *SseK1*, respectivamente. Los fragmentos generados para las mutaciones puntuales del promotor de *SseK1* tenían el mismo tamaño. El ensayo de unión se llevó a cabo como se describió previamente ([Tang et al., 2012](#)), con modificaciones. Se preparó una solución de ADN marcado con FAM y 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2 µM de His₆-PhoP

⁴⁰ **Tampón de fosforilación:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM acetilfosfato (Sigma-Aldrich).

fosforilada (His₆-PhoP-P) en tampón de unión⁴¹, en un volumen final de 20 µl. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos de ADN-proteína se sometieron a electroforesis, en condiciones no desnaturizantes y en frío, en geles al 6% de acrilamida/bisacrilamida (29:1) en tampón 0,5X Tris-borato-EDTA⁴². Las imágenes se adquirieron usando un sistema Fujifilm FLA-5100, y la cuantificación se realizó con el software *ImageJ*.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Ensayos de actividad β-galactosidasa

● Ensayo de actividad β-galactosidasa en bacterias

Los análisis de actividad β-galactosidasa se hicieron mediante el método de Miller ([Miller, 1972](#)) modificado por Maloy ([Maloy, 1990](#)), usando CHCl₃-SDS para permeabilizar las células. Las estirpes a ensayar se cultivaron en las condiciones en las que se quería medir la expresión génica. Tras el crecimiento, se mezclaron 555 µl de tampón Z⁴³ con 200 µl de células, 30 µl de cloroformo y 15 µl de SDS al 0.1%. Esto se mezcló en el agitador de vórtice y se incubó durante 5 min a 30°C. Se añadieron 200 µl de una solución de orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) a concentración de 4 mg/ml, se mezcló con el agitador de vórtice y se incubó a 30°C hasta que la mezcla de reacción se volvió amarilla. Se añadieron entonces 500 µl de una solución de Na₂CO₃ 1 M para detener la reacción. Los tubos se centrifugaron durante 15 min a 13000 rpm y se midió la absorbancia a 420 y 550 nm. La actividad β-galactosidasa se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (UM)} = \frac{D.O.420nm - 1,7 \times D.O.550nm}{V \times D.O.600nm \times \Delta t}$$

siendo UM las unidades Miller, V el volumen de cultivo en la reacción (ml), DO₆₀₀ la absorbancia del cultivo a longitud de onda de 600 nm, y t el tiempo de reacción (min).

● Ensayo de actividad β-galactosidasa en levaduras

⁴¹ **Tampón de unión:** 50 mM Tris-HCl pH 8 y 50 mM KCl.

⁴² **TBE 5X:** 1,1 M de Tris base, 900 mM de ácido Bórico, 25 mM EDTA, pH 8,3.

TBE 0,5X: 4500 ml de H₂O, 500 ml TBE 5X.

⁴³ **Tampón Z:** 16,1 g de Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 5,5 g de NaH₂PO₄ · H₂O, 0,75 g de KCl, 0,246 g de MgSO₄ · 7 H₂O, y H₂O hasta completar 1 L. Momentos antes de usar el tampón se añaden 2,7 ml de β-mercaptoetanol por litro.

El ensayo de actividad β -galactosidasa en levaduras se utilizó para confirmar los candidatos del escrutinio del doble híbrido. Se siguió un método descrito previamente (Breedon & Nasmyth, 1985). Se hicieron parches de las levaduras en medio selectivo DO-Leu-Trp. Se incubaron los parches hasta el día siguiente a 30°C y se realizaron réplicas con terciopelo en un filtro Whatman 40 sobre medio selectivo DO-Leu-Trp. Tras 24 h a 30°C, se permeabilizaron las levaduras al sumergir el filtro en nitrógeno líquido durante 15-30 s y, una vez descongelado, se depositó sobre papel Whatman 3 bañado en 3.3 ml de tampón Z suplementado con 8.1 μ l de β -mercaptoetanol y 15 μ l de X-gal 4%. Se incubó la reacción entre 2 y 16 h hasta observar coloración en los parches positivos. Como control positivo de esta actividad se usó una interacción ya conocida Ras-Raf (Van Aelst *et al.*, 1993; Vojtek *et al.*, 1993) con los plásmidos pLEX10-Ras^{V12} (Vojtek *et al.*, 1993) y pGAD1318-Raf (Van Aelst *et al.*, 1993).

Ensayos de actividad luciferasa

Se cultivaron las bacterias bajo condiciones de expresión de SPI1 y SPI2 y se transfirieron 150 μ l a placas de 96 pocillos de color blanco con el fondo transparente (Corning), la DO₆₀₀ y la bioluminiscencia se midió usando un lector de microplacas Synergy HT (BioTeK). Las condiciones utilizadas para tal medida fueron: Tipo de lectura, punto final; tiempo de integración, 1 s; emisión, agujero; posición, la parte superior; sensibilidad, 150.

Para medir la bioluminiscencia de bacterias intracelulares se cultivaron 3×10^4 células RAW264.7 por pocillo en placas blancas de 96 pocillos con el fondo transparente, y se infectaron 24 h más tarde con bacterias no invasivas (ver **Infección de macrófagos RAW264.7**). La bioluminiscencia se midió a 2, 4 y 8 h p.i.y el número de ufc/pocillo se calculó sembrando diluciones seriadas de los pocillos, después de la incubación con 1% de tritón X-100 en PBS durante 10 min a 37°C, en LB agar con Ap. Se contaron las colonias tras 24 h de incubación a 37°C.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

Ensayos de infección simple

● Infección de células HeLa y NRK-49F

Las células epiteliales HeLa y los fibroblastos NRK-49F se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de $1,5 \times 10^5$ células/pocillo y se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% CO₂ en medio DMEM sin antibióticos. Las bacterias se cultivaron en condiciones invasivas (LB 0,3 M NaCl en tubo sellado sin agitación durante toda la noche) y se añadieron a una MOI de 100 bacterias por cada célula. Las bacterias se centrifugaron sobre la monocapa de células a 200 g durante 5 min y, posteriormente, se incubó a 37°C con 5% CO₂. Tras 15 min, 50 min y 2 h de infección se recogieron algunas muestras para medir translocación. Para infecciones más largas, 1 h p.i. se lavó el cultivo celular dos veces con PBS, se cubrió con medio DMEM con 100 µg/ml de gentamicina (Gm) (Gm₁₀₀) y se incubó durante 1 h adicional (con este paso se eliminan las bacterias que no hayan entrado en las células hospedadoras). Después, el cultivo se lavó de nuevo y se le añadió DMEM con 16 µg/ml de Gm (Gm₁₆), tras lo que se incubó durante varias horas más.

● Infección de macrófagos RAW264.7

Para realizar infecciones de macrófagos en condiciones no invasivas, las células RAW264.7 se prepararon como se describe en el apartado anterior, y las bacterias se cultivaron en LB a 37°C durante 24 h en agitación [en estas condiciones las bacterias son mínimamente invasivas y no citotóxicas (Lundberg *et al.*, 1999)] y se añadieron a una MOI de 100. Las bacterias se centrifugaron sobre la monocapa de células a 200 g durante 5 min y, posteriormente, se incubó a 37°C con 5% CO₂. Tras 1 h de infección, el cultivo celular se lavó dos veces con PBS, se cubrió con medio DMEM con Gm₁₀₀ y se incubó durante 1 h adicional. Después, el cultivo se lavó de nuevo y se le añadió DMEM con Gm₁₆, tras lo que se incubó durante varias horas más. Las muestras se recogieron para medir translocación 4, 6, 12 y 24 h p.i.

Para infectar RAW264.7 en condiciones invasivas, las bacterias se cultivaron en LB 0,3 M NaCl a 37°C sin agitación durante toda la noche y se inocularon sobre el cultivo celular a una MOI de 100. Se recogieron las muestras a 1 y 2 h tras la infección.

Ensayos de infección mixta

Para la comparación de la capacidad de invasión y proliferación intracelular y virulencia (ver **ENSAYOS DE INFECCIÓN EN RATONES**) entre dos estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium, se llevaron a cabo ensayos de infección mixta y medida del índice de competitividad (IC), como se describe en (Segura *et al.*, 2004). Básicamente consiste en llevar a cabo la infección del mismo cultivo celular o del mismo ratón con una mezcla de estirpes bacterianas, una silvestre y una mutante, con el fin de reducir la variabilidad obtenida en este tipo de experimentos.

En los experimentos de invasión, proliferación e infección en ratones utilizamos como estirpe silvestre la estirpe que lleva una inserción en un gen no relacionado con virulencia (SV4608, 14028 *trg::MudJ* (Km^R)). Como estirpe mutante, la SV7070, que es un mutante nulo de *sseK1* en la estirpe de *Salmonella* 14028. Esta estirpe nos proporcionaba un mutante de delección *sseK1* y la SV4608 una herramienta para distinguir entre las dos estirpes, ya que, añadiendo X-Gal a las placas es posible distinguir colonias bacterianas mutantes de color blanco y colonias silvestres de color azul.

● Ensayos de invasión

Para los ensayos de invasión, las células epiteliales HeLa y Caco2, los fibroblastos NRK-49F, Cos7 y NIH3T3, y los macrófagos RAW264.7 y J774.1 se sembraron el día anterior a la infección en placas de 24 pocillos y se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂. Las bacterias se cultivaron en condiciones invasivas. Una mezcla 1:1 de las dos estirpes bacterianas se preparó en DMEM. El número de unidades formadoras de colonias (ufc) de las dos estirpes en la entrada se calculó tras la siembra de diluciones en serie del inóculo, usando X-Gal o resistencias a antibióticos para distinguir entre estirpes. La mezcla de bacterias se añadió al cultivo a una MOI de 25 y se centrifugó la placa a 200 g 5 min. Treinta min tras la infección, las células se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con DMEM fresco con Gm₁₀₀ durante 90 min. El número de bacterias viables intracelulares se obtuvo tras la lisis de las células infectadas con Tritón X-100 al 1% y la siembra en placas con X-Gal. El índice de competitividad en invasión (ICI) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$ICI = \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}} (2h) / \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}} (\text{inóculo})$$

● Ensayos de proliferación y supervivencia intracelular

Las líneas celulares RAW264.7 y J774.1 se sembraron y cultivaron en las mismas condiciones que para los ensayos de invasión, si bien las bacterias se cultivaron en condiciones no invasivas para los ensayos con estas células, para el resto de líneas celulares se cultivaron las bacterias en condiciones invasivas. Se preparó en DMEM una mezcla 1:1 de las dos estirpes bacterianas y se añadió al cultivo celular a una MOI de 25, centrifugando posteriormente la placa a 200 g 5 min. Quince min tras la infección, las células se lavaron con PBS y se incubaron en DMEM fresco con Gm₁₀₀. Sesenta min después, la concentración de Gm se redujo a 16 µg/ml, tras un lavado adicional con PBS. El número de bacterias intracelulares viables se obtuvo como se ha descrito para los ensayos de invasión, 1,25 h y 24 h tras la infección. El IC en proliferación (ICP) se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{ICP} = \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}}(24 \text{ h}) / \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}}(1,25 \text{ h})$$

Análisis de la translocación de efectores a la célula eucariota

Tras la infección de las células eucariotas (ver apartados de Ensayos de infección simple), la translocación de las fusiones CyaA' al interior de las células eucariotas se analizó mediante medición de los niveles de AMPc.

Para ello se lisaron las células infectadas y se determinó el nivel de AMPc en los lisados utilizando un método colorimétrico, suministrado por Arbor Assays (*DetectX® Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit*), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los datos se representaron como porcentaje del nivel máximo de AMPc medido en cada experimento.

ENSAYOS DE INFECCIÓN EN RATONES

Para los ensayos de virulencia se usaron ratonas BALB/c de 7 semanas (Charles River Laboratories, Santa Perpetua de Mogoda, España) siguiendo el protocolo descrito anteriormente ([Beuzón & Holden, 2001](#)).

Infección oral

Para la inoculación por vía oral, se utilizaron cultivos crecidos en condiciones invasivas. La inoculación se llevó a cabo suministrando 25 µl de una solución salina (NaCl 0,9%) con 0,1% de lactosa y 5×10^8 ufc/ml de cada estirpe. Las bacterias se recuperaron del bazo transcurridos 5-6 días.

Infección intraperitoneal

Para las infecciones por vía intraperitoneal, se diluyeron cultivos obtenidos en condiciones no invasivas 100 veces en medio fresco y se dejaron crecer hasta una DO_{600} de 0,3-0,6. A las ratonas se les suministraron 200 µl de una solución salina con 2.5×10^5 ufc/ml de cada estirpe. Las bacterias se recuperaron del bazo transcurridas 48 h.

En ambos tipos de infecciones se realizó el conteo de ufc en medio LB con y sin Km y se calculó el IC aplicando la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}}(\text{bazo}) / \frac{\text{ufc del mutante}}{\text{ufc del silvestre}}(\text{inóculo})$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se empleó el programa *Libre office 5.0 Calc* para el cálculo de las medias y desviaciones típicas de los ensayos realizados. Además, se utilizó el test de la *t* de Student para analizar diferencias en los valores de algunos de los resultados obtenidos. Valores *P* menores o iguales a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

**Capítulo 1: Generación de fusiones
CyaA' para el estudio de la
translocación de efectores de los
T3SS de *S. enterica* serovar
Typhimurium**

Análisis de fusiones CyaA' aleatorias

En un trabajo previo realizado en el laboratorio se había puesto a punto la metodología para generar fusiones traduccionales aleatorias con el dominio catalítico de la adenilato ciclasa CyaA de *Bordetella pertussis* en el genoma de *Salmonella*. La actividad de esta adenilato ciclasa es dependiente de calmodulina. No hay calmodulina en las bacterias pero sí en el citosol de las células eucarióticas hospedadoras. Por tanto, la translocación de una de estas fusiones desde *Salmonella* hacia la célula hospedadora se puede detectar como un aumento en los niveles de AMPc en los cultivos de células infectadas. Así se podrían encontrar genes candidatos a codificar nuevos efectores de los T3SS o al menos generar una herramienta útil para el estudio de un efector ya conocido.

Se llevó a cabo la mutagénesis de *S. enterica* serovar Typhimurium estirpe 14028 $\Delta slrP::Cm \Delta SPI1 \Delta SPI2$ con mini-Tn5cyaA' para obtener fusiones traduccionales. Puesto que uno de los objetivos era detectar genes para nuevos efectores, se empleó una estirpe que llevaba delecionadas las dos islas principales de patogenicidad ya que en ellas se encuentra un número significativo de genes que codifican efectores ya conocidos. La sustitución del gen *slrP* por un gen de resistencia a cloranfenicol, además de evitar la obtención de fusiones con otro de los efectores conocidos (SlrP) permitía la contraselección de la estirpe de *E. coli* que se usaba como donante del mini-Tn5 en estos experimentos.

Los mutantes obtenidos se agruparon en colecciones de 100 mutantes diferentes, se lisaron con el bacteriófago P22, y las inserciones se transfirieron por transducción a la estirpe silvestre. Este paso era necesario ya que el mutante con las islas delecionadas no habría sido capaz de llevar a cabo las infecciones ni de translocar las fusiones en los experimentos posteriores. Las colecciones de fusiones en fondo silvestre se usaron para infectar células humanas epiteliales HeLa en condiciones de inducción de SPI1 (invasivas), y macrófagos de ratón RAW264.7 en condiciones no invasivas. Se analizaron 225 colecciones en cada una de las condiciones lo que representa un total de 22500 mutantes. Tras las infecciones, 2 h en el caso de células HeLa y 8 h en los macrófagos, se determinó la concentración de AMPc en los cultivos celulares. Las bacterias que provenían de colecciones que causaron un aumento de al menos 10 veces en los niveles de AMPc respecto al ruido de fondo se subdividieron en colecciones de 10 mutantes y se probaron de nuevo y de aquí se pasó a bacterias

individuales. En total se obtuvieron 6 clones positivos denominados S59A3.2, S4C10.6, S41B2.10, S37A8.5, S47A2.3 y T122A2.7. Se empleó un método de PCR semialeatoria (ver **Materiales y Métodos**) para amplificar la región genómica adyacente a la inserción del mini-Tn5 $cyaA'$ en cada uno de los clones positivos y se secuenció esa región. Los genes identificados fueron *pipB2* (Knodler *et al.*, 2003), *sipA* (dos veces) (Kaniga *et al.*, 1995), *sopE2* (Bakshi *et al.*, 2000) y *steB* (dos veces) (Geddes *et al.*, 2005) como se puede observar en la Tabla R1.1. Los productos de estos genes son efectores de los T3SS de *S. enterica* y, si bien no se encontraron efectores nuevos, confirman la utilidad de los análisis basados en fusiones $CyaA'$ para detectar sustratos de los T3SS.

Tabla R1.1: Lista de genes de efectores de T3SS detectados en el escrutinio con mini-Tn5 $cyaA'$

Gen	Candidato	Localización cromosómica	Tamaño de la proteína	Aminoácidos en la fusión
<i>pipB2</i>	S59A3.2	Fuera de SPI1 y SPI2	350	1-336
<i>sipA</i>	S4C10.6	SPI1	685	1-519
<i>sipA</i>	S41B2.10	SPI1	685	1-557
<i>sopE2</i>	S37A8.5	Bacteriófago	240	1-75
<i>steB</i>	S47A2.3	Fuera de SPI1 y SPI2	133	1-72
<i>steB</i>	T122A2.7	Fuera de SPI1 y SPI2	133	1-72

Estos resultados se obtuvieron en las infecciones de células HeLa en condiciones invasivas 2 h tras la infección. En esas condiciones el T3SS1 está activo mientras que el T3SS2 aun no se ha expresado. La identificación de PipB2 en esas condiciones resultó sorprendente ya que este efector estaba descrito sólo como sustrato del T3SS2. Por ello se decidió explorar más profundamente este resultado.

PipB2 se transloca a la célula hospedadora a través del T3SS1

Para investigar si PipB2 puede translocarse a través del T3SS1, se probó la translocación de la fusión cromosómica PipB2- $CyaA'$ obtenida en el escrutinio del apartado anterior en diferentes fondos genéticos: silvestre, Δ SPI1 (sin T3SS1) y Δ SPI2 (sin T3SS2). Se cultivaron las bacterias en condiciones de inducción de SPI1 y se midieron los niveles de AMPc 2 h después de la infección. Como se puede observar en la **Figura R1.1**, PipB2 puede translocarse a la célula hospedadora desde la estirpe silvestre y desde la estirpe Δ SPI2, pero no desde la estirpe Δ SPI1, lo que sugiere que el T3SS1 es esencial para la translocación de PipB2 en esas condiciones, no siendo esencial el

T3SS2. Estos resultados se obtuvieron en tres tipos celulares diferentes provenientes de tres mamíferos distintos: células epiteliales humanas HeLa, macrófagos de ratón RAW264.7 y fibroblastos de rata NRK.

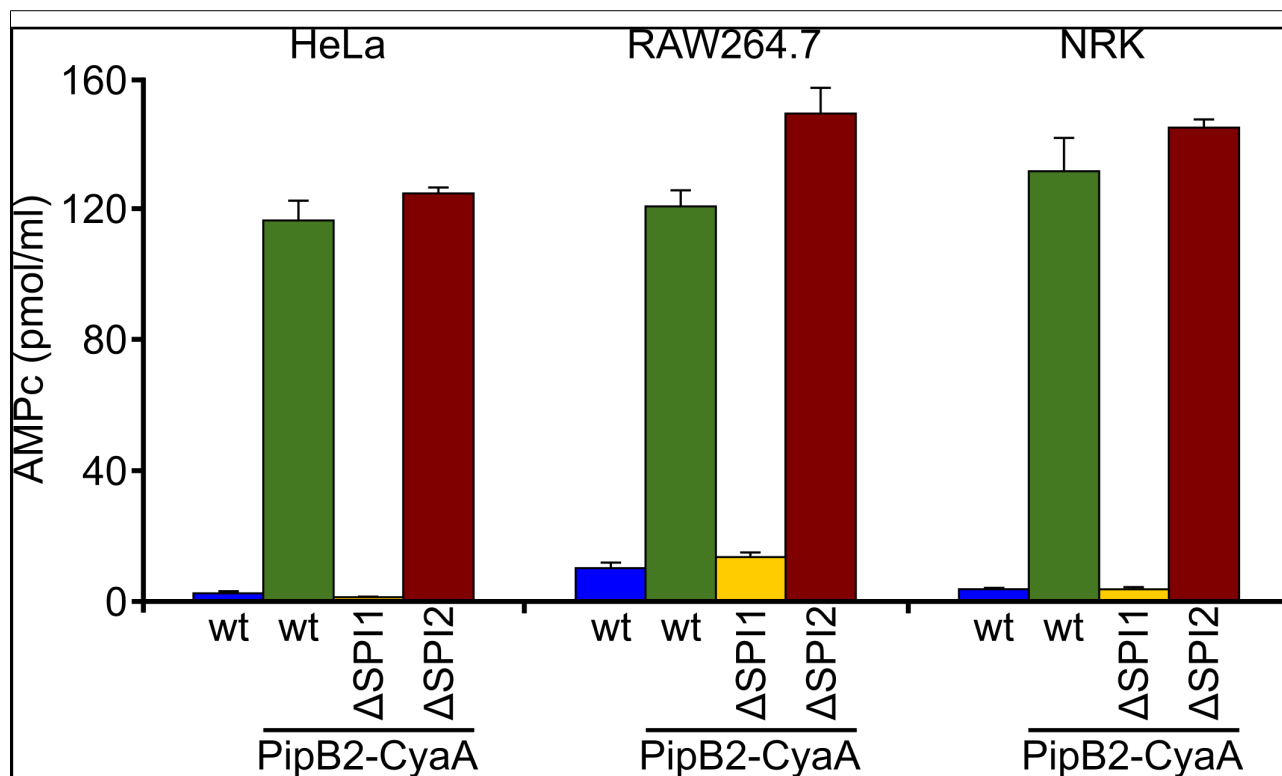


Figura R1.1: Translocación de PipB2 dependiente del T3SS1 en células HeLa, RAW264.7 y NRK. Las células HeLa y NRK se infectaron con un MOI de 100:1 con bacterias que se cultivaron toda la noche en LB 0,3M de NaCl sin aireación. Las células RAW264.7 se infectaron con un MOI de 100:1 con bacterias que se cultivaron durante 24 horas en agitación en LB. Se usó *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 (silvestre, wt) y los mutantes carentes de SPI1 o SPI2. Las estirpes indicadas llevan una inserción del mini-Tn5cyaA' en *pipB2* que generó una fusión traduccional (PipB2-CyaA'). La concentración de AMPc en los cultivos infectados se midió 2 h después de la infección como una indicación de la translocación de la fusión PipB2-CyaA. Se representan las medias y desviaciones típicas de experimentos duplicados.

Cinética de translocación de PipB2 en células hospedadoras dependiente de T3SS1 y T3SS2

Los resultados del apartado anterior indican que PipB2 puede translocarse a las células hospedadoras no sólo a través del T3SS2 como se había descrito previamente sino también por medio del T3SS1. Por ese motivo se decidió analizar la contribución de ambos sistemas en la translocación de este efector estudiando la cinética de translocación de PipB2 en células HeLa y RAW264.7.

Las células no fagocíticas HeLa se infectaron con bacterias que habían crecido en condiciones invasivas, que optimizan la expresión de la SPI1, y los niveles de AMPc, que son indicativos de translocación, se midieron en cinco momentos después de la infección. En la **Figura R1.2A** se muestra como la translocación de PipB2 se observó desde 2 horas después de la infección hasta el final del experimento (16 h) y que esta translocación es dependiente del T3SS1 e independiente del T3SS2. Esto sugiere que, en células epiteliales, PipB2 puede translocarse a través del T3SS1, no sólo durante la invasión sino también desde dentro de la célula hospedadora. Esto es coherente con datos previos que muestran que el T3SS1 se expresa también dentro de las células epiteliales en etapas tardías de la infección ([Hautefort et al., 2008](#)).

Las células fagocíticas pueden ser infectadas con bacterias en condiciones tanto invasivas como no invasivas. Sin embargo, la infección en condiciones invasivas provoca la muerte rápida por piroptosis en macrófagos ([Fink & Cookson, 2007](#)). Por ello, las células RAW264.7 se infectaron con bacterias en condiciones invasivas para los puntos de 30 minutos y 2 horas, y con bacterias en condiciones no invasivas para infecciones a tiempo largo, para evitar la muerte celular temprana. El resultado mostrado en la **Figura R1.2B** sugiere que PipB2 se secreta a través del T3SS1 durante la invasión de los macrófagos (30 min y 2 h después de la infección), y a través del T3SS2 cuando las bacterias están establecidas en su nicho intracelular (8 y 16 h después de la infección). La ausencia de translocación a 4 h después de la infección sugiere que las bacterias no invasivas usadas para esta infección no expresan ningún T3SS en este punto.

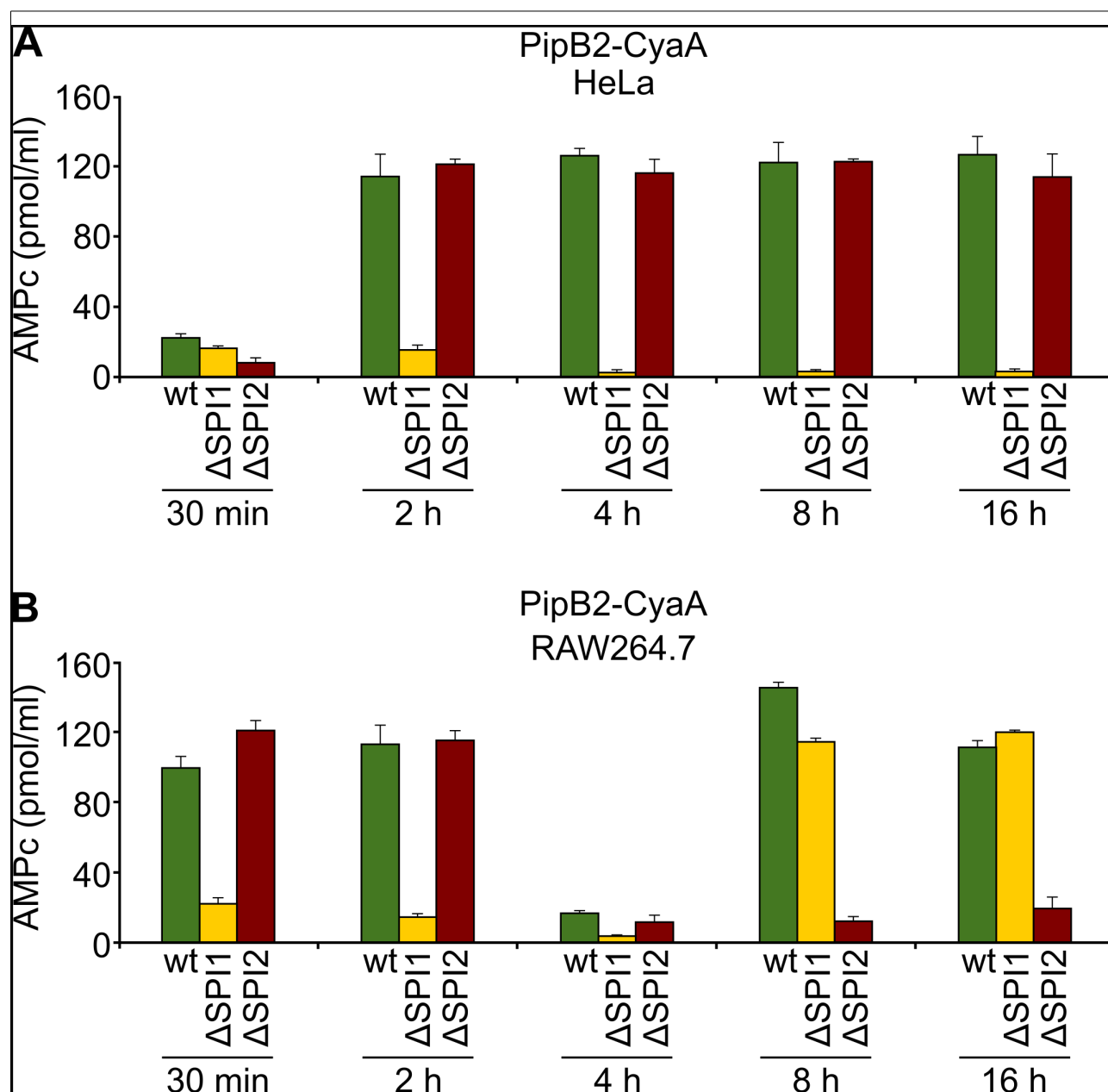
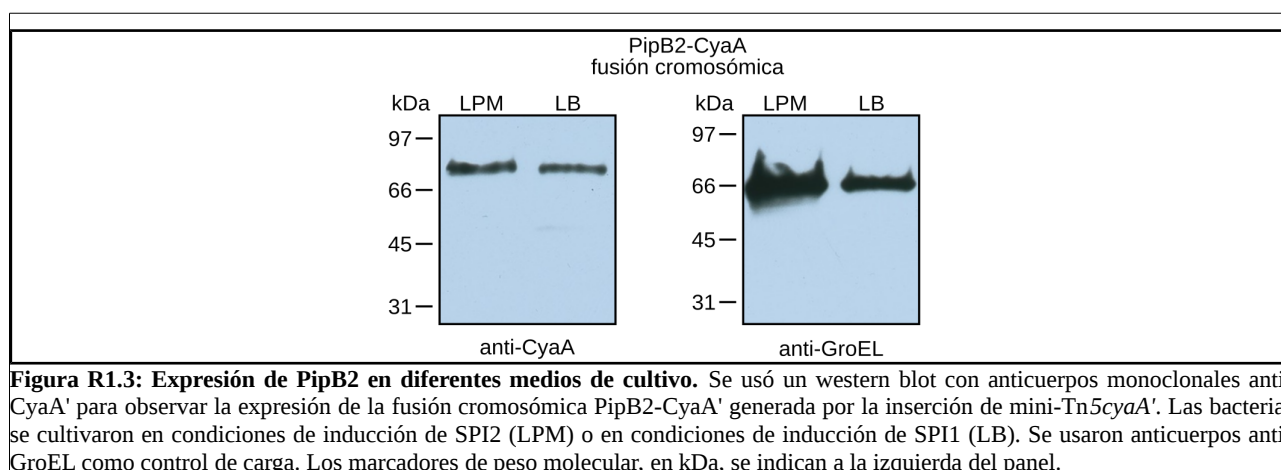


Figura R1.2: Cinética de translocación de PipB2 al interior de células hospedadoras. Células epiteliales HeLa (**A**) o macrófagos RAW264.7 (**B**) se infectaron con *S. enterica* serovar Typhimurium silvestre (wt), Δ SPI1 o Δ SPI2, que expresaban la fusión PipB2-CyaA' generada por inserción de mini-Tn5cyaA' en *pipB2*. Para analizar la translocación, los niveles de AMPc se midieron 30 minutos, 2, 4, 8 y 16 h después de la infección. Se representan las medias y desviaciones típicas provenientes de experimentos duplicados.

Síntesis de PipB2 bajo condiciones de inducción de SPI1 y SPI2

Datos previos indicaban que *pipB2* se expresaba bajo condiciones de crecimiento que inducían la expresión de la SPI2 (Knodler *et al.*, 2003), lo cual era coherente con la translocación de PipB2 a

través del T3SS2. Nuestros resultados muestran que esta proteína es también un sustrato del T3SS1 lo que sugiere que *pipB2* podría también expresarse bajo condiciones de crecimiento que inducen la expresión de la SPI1. Para probar esta predicción aprovechamos la fusión cromosómica *pipB2-cyaA'*, la cual se expresa desde el promotor endógeno de *pipB2*. Las bacterias con la fusión se cultivaron toda la noche en medio LPM (condiciones de crecimiento que inducen la expresión de la SPI2) y LB 0,3 M NaCl sin aireación (condiciones de crecimiento que inducen la expresión de la SPI1) y los niveles de proteína PipB2-CyaA' se midieron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-CyaA'. Los niveles de PipB2 fueron similares en ambos medios (Figura R1.3). Este resultado confirma que *Salmonella* acumula una cantidad significativa de PipB2 cuando el T3SS1 está montado.



Análisis de la secuencia señal necesaria para la translocación de PipB2 a través del T3SS1

El último paso del estudio de la translocación de PipB2 consistió en el análisis de la señal mínima necesaria para la secreción. Con este fin se generaron varias fusiones CyaA' que contenían diferentes fragmentos de PipB2, que se expresaron desde un promotor constitutivo en un plásmido. La expresión de cada fusión se confirmó por inmunoblot (**Figura R1.4**).

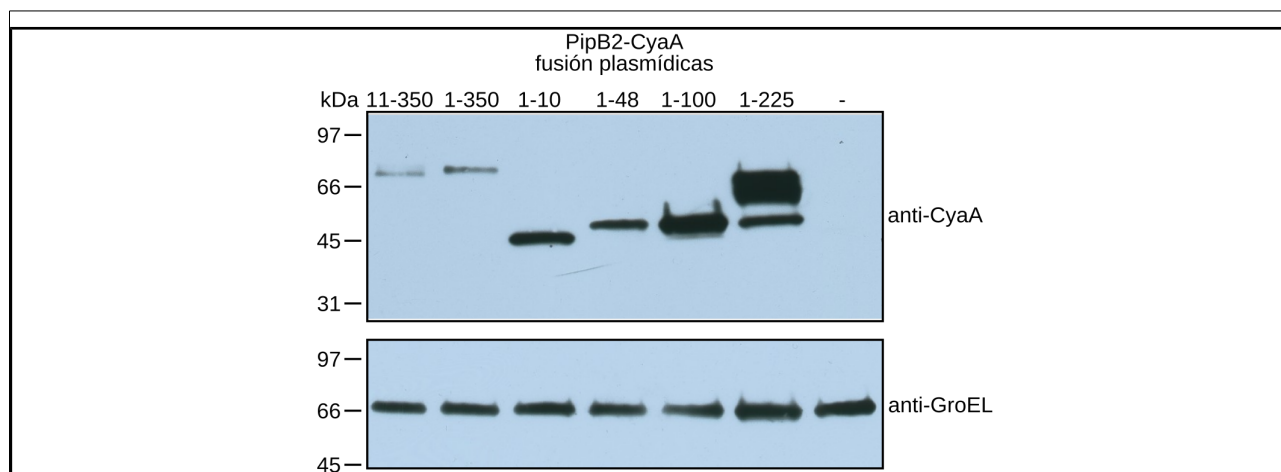


Figura R1.4: Expresión de las fusiones PipB2-CyaA' plasmídicas. Estirpes derivadas de *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 portadoras de plásmidos que expresan la proteína completa (1-350) o diferentes fragmentos de PipB2 fusionados con CyaA' de *B. pertussis* (se indica el número de aminoácidos de PipB2 presentes en la fusión) se cultivaron toda la noche en LB. La presencia de las fusiones CyaA' en lisados celulares (correspondientes a 10^8 células) se analizó mediante inmunoblot con anticuerpos anti-CyaA (panel superior). Se usaron anticuerpos anti-GroEL como control de carga. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda del panel.

La translocación de las fusiones en células HeLa (**Figura R1.5A**) y en macrófagos RAW264.7 (**Figura R1.5B**) se analizó 16 horas tras la infección. Además de la proteína completa (1-350) y el fragmento de 1 a 225 aminoácidos, previamente descrito como suficiente para la translocación de PipB2 (Knodler *et al.*, 2003), los 10 primeros residuos del extremo N-terminal de PipB2 fueron capaces de dirigir la translocación de CyaA' en ambos tipos celulares. En concordancia con estos resultados el fragmento de PipB2 que incluye los aminoácidos 11-350 no fue capaz de translocar CyaA' al interior de las células hospedadoras. Finalmente, la translocación de los fragmentos N-terminales (aminoácidos 1-10 y 1-225) se examinó a las 16 horas de infección en tres fondos genéticos diferentes: silvestre, Δ SPI1 y Δ SPI2. Ambos fragmentos se translocaron a las células HeLa de manera dependiente del T3SS1 (**Figura R1.5C**), y a las células RAW264.7 de manera dependiente del T3SS2 (**Figura R1.5D**). Estos resultados confirman que PipB2 es un sustrato de ambos T3SS y que la secuencia señal necesaria para la translocación a través de ambos sistemas son los 10 primeros aminoácidos del extremo N-terminal.

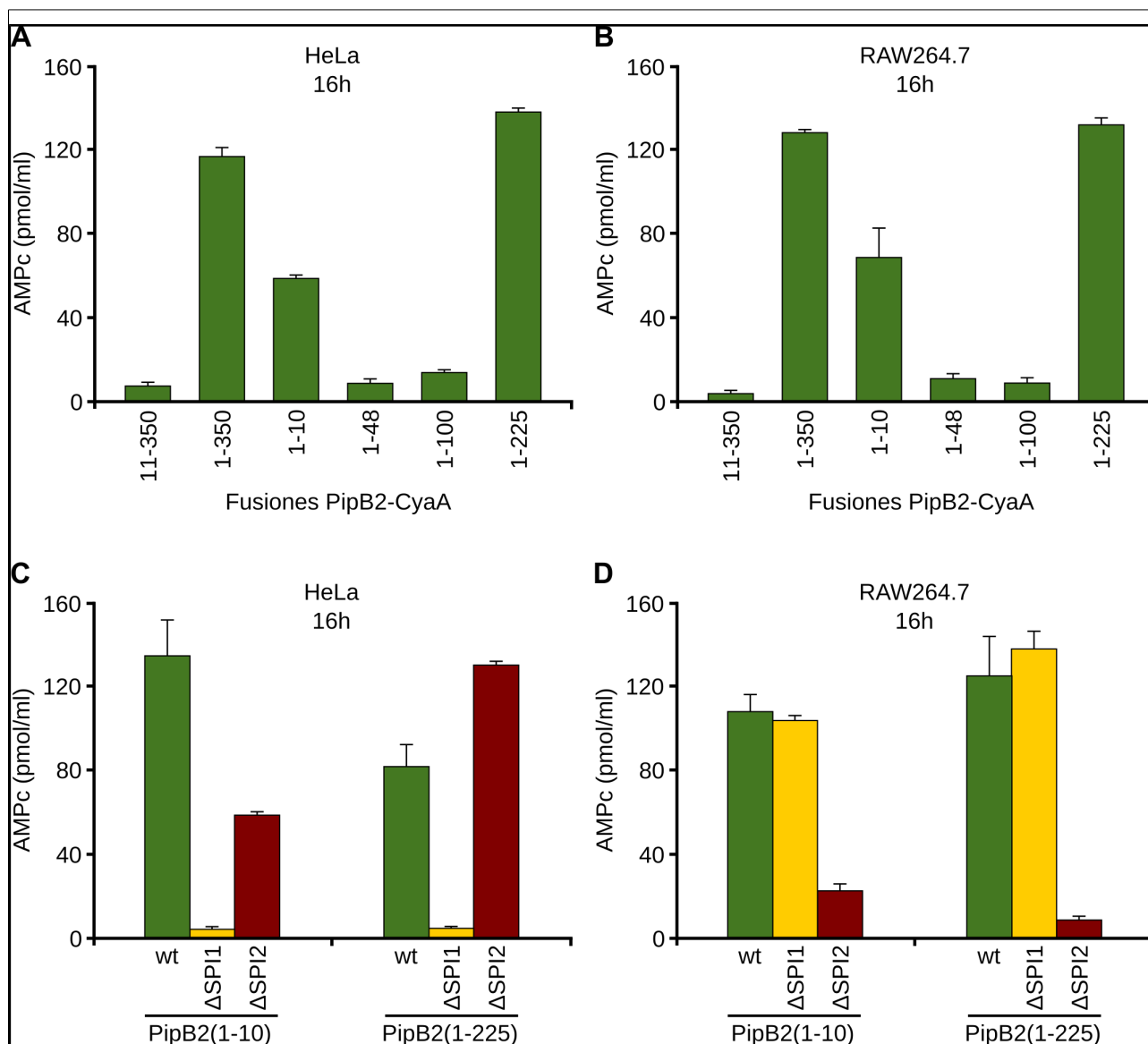


Figura R1.5: Análisis de translocación de fragmentos de PipB2. Células HeLa (**A**) o RAW264.7 (**B**) se cultivaron en placas de 24 pocillos y se infectaron con derivados de la estirpe silvestre de *S. enterica* serovar Typhimurium que expresaban fragmentos de PipB2 (el número de aminoácidos está indicado) en fusión traduccional con el dominio catalítico de CyaA' de *B. pertussis*. Células HeLa (**C**) o RAW264.7 (**D**) se infectaron con las estirpes silvestre (wt), Δ SP11 o Δ SP12 de *S. enterica* serovar Typhimurium que expresaban PipB2(1-10)-CyaA' o PipB2(1-225)-CyaA'. La concentración de AMPc se midió 16 h después de la infección. Las medias y desviaciones típicas representadas corresponden a experimentos duplicados.

Generación de fusiones CyaA' dirigidas en el cromosoma de *S. enterica*

Como se ha visto en la primera parte de este capítulo, la generación de fusiones CyaA' es una herramienta útil para el estudio de la translocación de efectores de T3SS. Si se quiere usar esta herramienta para estudiar un efector concreto es preciso generar fusiones dirigidas en lugar de

aleatorias. Para ello se utilizan habitualmente vectores plasmídicos adecuados (Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2011; Cordero-Alba *et al.*, 2012; Valinsky *et al.*, 2002). A pesar de su utilidad esos vectores tienen dos inconvenientes: están en varias copias y la expresión de la fusión está controlada por un promotor constitutivo. Esto puede tener como consecuencia que el efector se produzca y se transloque en condiciones no fisiológicas. Por ello nos propusimos, como segundo objetivo de este capítulo, poner a punto un método para generar fusiones traduccionales CyaA' directamente en el cromosoma de *Salmonella* y aplicar este método al efector SseK1, que será el objeto de estudio en los restantes capítulos de la tesis.

El método empleado, que se esquematiza en la **Figura R1.6**, está basado en otro desarrollado previamente por Datsenko y Wanner (Datsenko & Wanner, 2000) con el objetivo inicial de interrumpir genes en el cromosoma de *E. coli* introduciendo un gen que confiere resistencia a un antibiótico. Este gen se amplifica por PCR y en los cebadores empleados se incluyen extensiones de 40 bases que proporcionan las regiones de homología con el gen diana. Este procedimiento requiere la recombinasa Red del fago lambda que se sintetiza bajo el control de un promotor inducible en un plásmido de bajo número de copias fácilmente curable (pKD46).

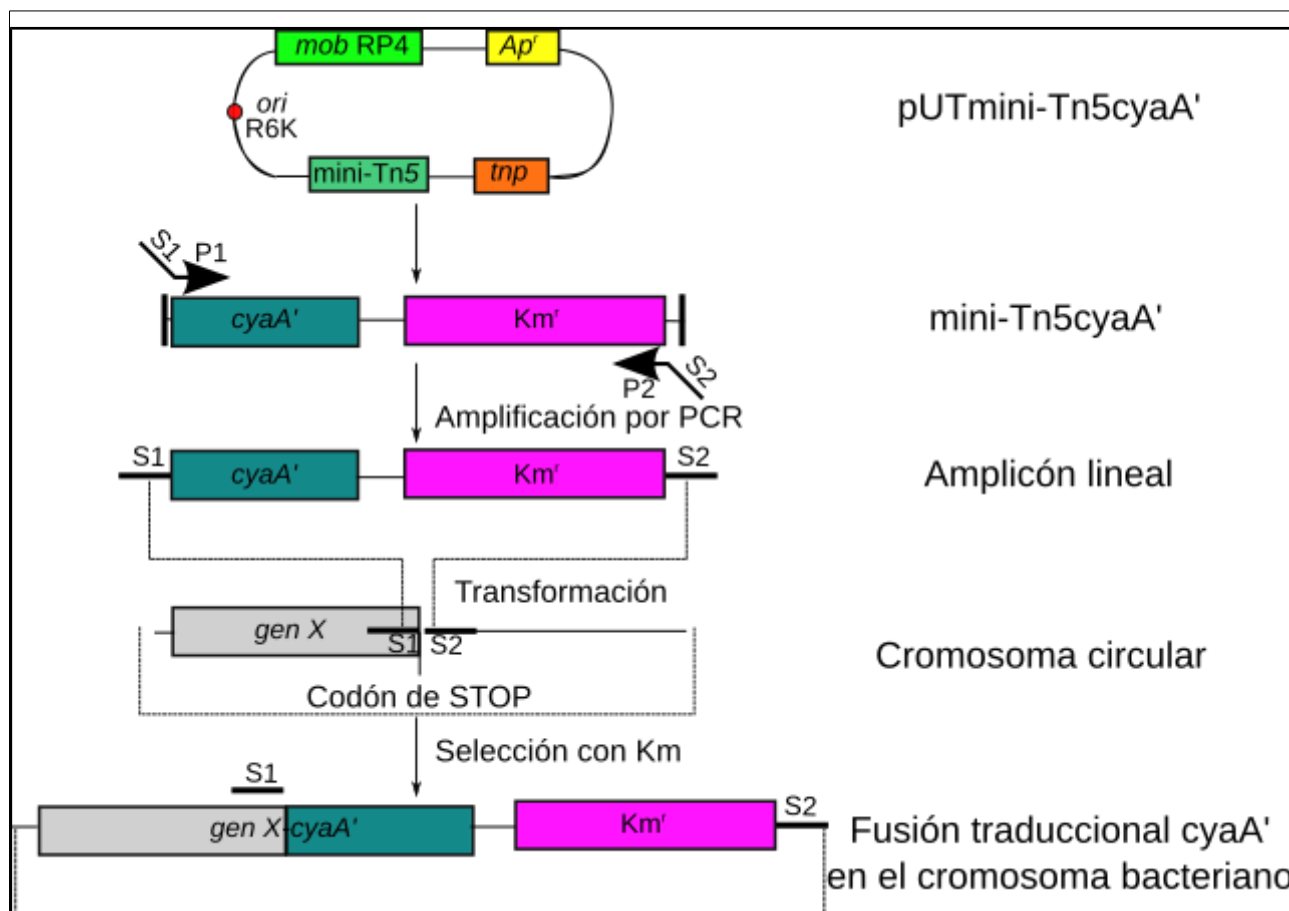


Figura R1.6: Representación esquemática del protocolo para generar fusiones CyaA' en el cromosoma bacteriano de manera dirigida. Además del minitransposón, el plásmido contiene un gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina (*Ap'*), un gen *tnp* que codifica la transposasa de Tn5, el origen de replicación R6K (*oriR6K*) y la región RP4 *oriT* para la conjugación (*mobRP4*). P1 y P2 son los cebadores para la amplificación de un fragmento de pUTmini-Tn5cyaA'. S1 y S2 son las regiones homólogas y específicas del cromosoma bacteriano necesarias para la inserción del fragmento amplificado en un sitio definido en el cromosoma.

Como molde para la amplificación del fragmento de *cyaA* que codifica el dominio catalítico de CyaA de *B. pertussis* junto con el gen de resistencia a Km se empleó el plásmido pUTmini-Tn5cyaA'. Este es el plásmido usado para la obtención de fusiones aleatorias y tiene la ventaja de ser un plásmido suicida en la estirpe silvestre de *Salmonella*. Con objeto de introducir el fragmento de *cyaA* justo delante del codón de parada de *sseK1* se emplearon como cebadores para la amplificación los oligonucleótidos SseK1P1 y SseK1P2. Tras la transformación de la estirpe 14028/pKD46 de *S. enterica* serovar Typhimurium con el producto de PCR se esperaba obtener, mediante recombinación, una fusión entre la secuencia codificante completa de *sseK1* y el fragmento de *cyaA* amplificado. Los recombinantes se seleccionaron en medio LB suplementado con Km y la fusión se reconstruyó mediante transducción en la estirpe silvestre 14028.

La verificación de que la fusión se había obtenido correctamente se realizó por dos vías: (i) PCR para confirmar la estructura y localización de la fusión; (ii) western blot para verificar la

expresión de la proteína de fusión y su tamaño. (i) Se realizaron dos reacciones de PCR tanto sobre la estirpe con la fusión como sobre la estirpe silvestre como control. En la primera reacción se emplearon dos cebadores externos, SseK1E1 y SseK1E2, que debían amplificar la región codificante completa de *sseK1* y debían dar lugar a un producto unas 3 kb mayor en la estirpe con la fusión que en la estirpe silvestre, debido a la inserción de *cyaA'* y el gen de resistencia a Km. En la segunda reacción se usó el oligonucleótido SseKE1 junto con el cebador CyaArev. En este caso se esperaba una amplificación de un fragmento de 1,2 kb si la fusión era correcta y no se esperaba amplificación en la estirpe silvestre. En ambos casos los resultados fueron los esperados (**Figura R1.7**).

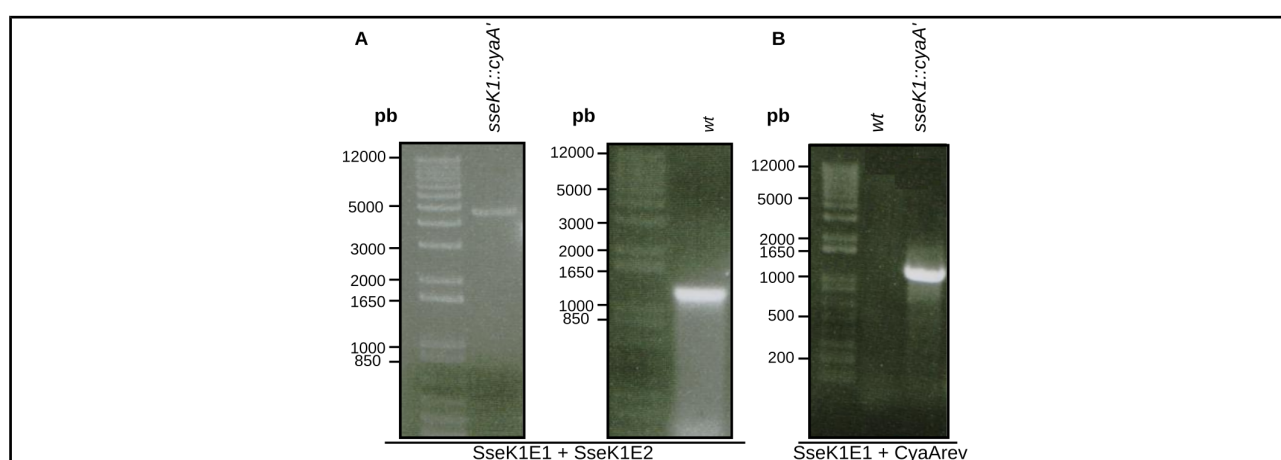


Figura R1.7: Comprobación de la fusión *sseK1::cyaA'* en el cromosoma. (A) Se usaron los oligonucleótidos SseK1E1 y SseK1E2 (panel izquierdo y central) observándose una banda de una 3 Kb mayor en la estirpe que porta la fusión que en la estirpe silvestre. (B) Se usaron los oligonucleótidos SseK1E1 y CyaArev (panel derecho) observándose una banda de 1,2 Kb en la estirpe que porta la fusión y nada en la estirpe silvestre. Se muestran los tamaños en pb de los marcadores de peso moleculares a la izquierda de cada panel.

(ii) Para el western se prepararon lisados de cultivos bacterianos hirviendo directamente las bacterias en tampón de Laemmli 4x. Se utilizó un anticuerpo anti-CyaA y fue posible detectar una banda de unos 82 kDa que era el tamaño esperado para la suma de SseK1 (39 kDa) y el fragmento catalítico de CyaA (43 kDa) (**Figura R1.8**).

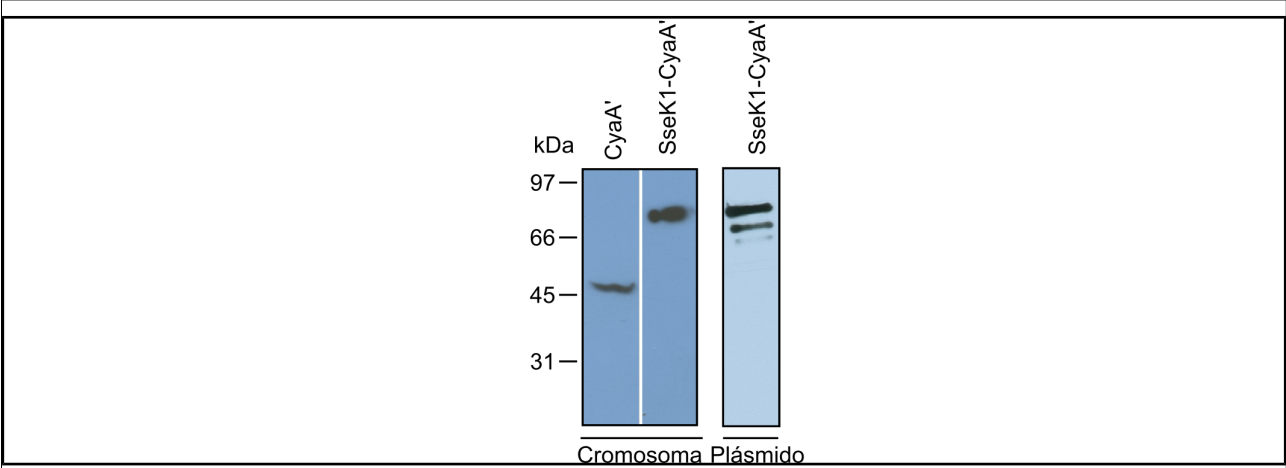


Figura R1.8: Expresión de las fusiones SseK1-CyaA'. Se uso un western blot con anticuerpos monoclonales anti-CyaA' para observar la expresión de la fusión cromosómica SseK1-CyaA' generada por la inserción de mini-Tn5cyaA' de manera dirigida. Se muestra la fusión de la proteína SseK1 completa y una fusión que solo incluye la metionina inicial de SseK1 (panel izquierdo). Las bacterias se cultivaron en LPM toda la noche. También se muestra la expresión de la fusión plasmídica SseK1 en el plásmido pSIFc, bajo un promotor de expresión constitutiva (panel derecho). Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda del panel.

Capítulo 2: Análisis de la regulación de la expresión y de la translocación a células hospedadoras del efector SseK1

En los dos capítulos restantes de la tesis se aborda el estudio de SseK1, un efector de los T3SS de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium del que se tenían muy pocos datos al inicio de esta tesis. En este capítulo se estudia la contribución de SseK1 a la virulencia, la regulación de la expresión del gen *sseK1* y las condiciones para la translocación del efector, usando la herramienta generada para ello en el capítulo anterior.

Contribución de SseK1 a la virulencia en ratones

El papel de SseK1 y SseK2, otro efector de la misma familia, en la virulencia se evaluó previamente mediante la infección de ratones BALB/c con mutantes *sseK1*, *sseK2* o *sseK1 sseK2*, pero no se encontró atenuación mediante un ensayo de tiempo medio de muerte después de la infecciones intraperitoneales (Kujat Choy et al., 2004). Más recientemente, un método más sensible, el cálculo del índice de competitividad (IC) en infecciones mixtas, reveló una atenuación del triple mutante *sseK1 sseK2 sseK3* y del doble mutante *sseK1 sseK2*, pero no del mutante simple *sseK3*, después de una infección oral (Brown et al., 2011). Estos resultados previos nos llevaron a analizar la contribución específica de SseK1 en la virulencia de *Salmonella*. Se generó un mutante nulo de *sseK1* y se calculó su IC con respecto a la estirpe silvestre (*S. enterica* serovar Typhimurium 14028). Se observó una atenuación significativa ($P < 0,05$) del mutante tanto en infecciones orales como intraperitoneales de ratones BALB/c (Figura R2.1).

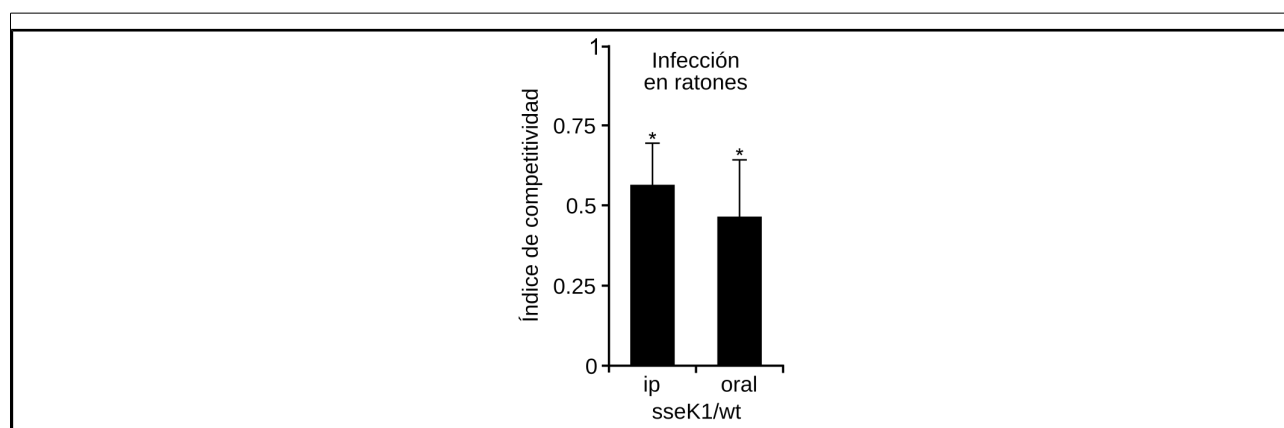


Figura R2.1: Análisis del índice de competitividad (IC) en ratones para un mutante nulo *sseK1*. Representación gráfica del IC de la estirpe que lleva una mutación nula en *sseK1* después de infecciones intraperitoneales (ip) y orales en ratones. Las barras de error representan la SD. wt, es la estirpe silvestre. Los asteriscos denotan que los ICs eran significativamente diferentes de 1 para una $P < 0,05$ en la prueba t de Student

La contribución específica de SseK1 en la invasión y en la proliferación intracelular se evaluó calculando el IC del mutante *sseK1* contra la estirpe *trg::MudJ* [silvestre para la invasión y la proliferación intracelular (Segura et al., 2004)] en varios tipos celulares de mamíferos: HeLa (epiteliales humanas), NRK-49F (fibroblastos de rata), RAW264.7 (macrófagos de ratón), Cos-7 (fibroblastos de mono), 3T3 (fibroblastos de ratón), J774.A1 (macrófagos de ratón) y Caco2 (epiteliales humanas). No se detectaron defectos significativos para el mutante *sseK1* ($P > 0,05$; **Figura R2.2**). En conjunto, los resultados mostrados en este apartado sugieren que SseK1 es necesario para la virulencia completa de *Salmonella* en ratones pero que no contribuye específicamente ni a la invasión ni a la proliferación intracelular, al menos en los tipos celulares y en las condiciones probadas.

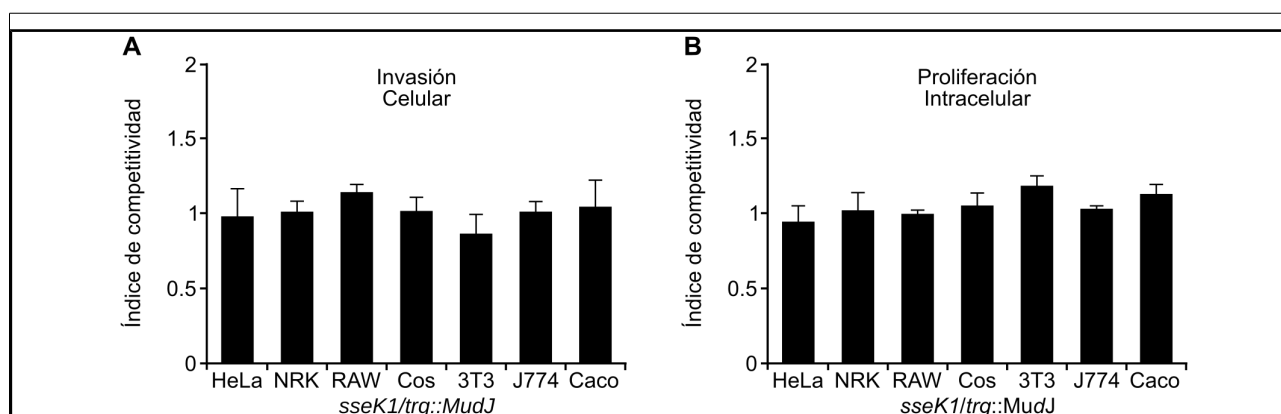


Figura R2.2: Análisis del índice de competitividad (IC) en cultivos celulares para un mutante nulo *sseK1*. (A) Análisis de la invasión del mutante *sseK1* en infecciones mixtas con el mutante *trg::MudJ*, que se usó como estirpe silvestre. (B) Análisis de la proliferación intracelular del mutante *sseK1* en infecciones mixtas con el mutante *trg::MudJ*, que se usó como estirpe control. Los ICs representados son la media de tres infecciones. Las barras de error representan la SD. wt, es la estirpe silvestre.

Síntesis y translocación en células de mamíferos de SseK1 en condiciones de inducción de la SPI1 y la SPI2

Aunque la expresión y secreción al medio de cultivo de SseK1 se ha detectado en condiciones de inducción de la SPI1 y la SPI2, este efector de *Salmonella* se ha descrito como sustrato de translocación específico del T3SS2 en células epiteliales HeLa (Kujat Choy et al., 2004). Estos resultados previos se obtuvieron empleando fusiones SseK1-2HA y SseK1-CyaA' expresadas desde plásmidos. Para llevar a cabo un análisis más detallado de la expresión de *sseK1*, se construyó una fusión *lacZ* traduccional en el cromosoma de *Salmonella* en el locus nativo de *sseK1*. Esta fusión

permite la cuantificación de los niveles fisiológicos de expresión de dicho gen mediante la medida de actividad β -galactosidasa. Como se puede observar en la **Figura R2.3A**, *sseK1* se expresó en condiciones de inducción de la SPI1 (LB, 0,3 M NaCl sin aireación) pero su expresión fue significativamente mayor ($P < 0,01$) en condiciones de inducción de la SPI2 (LPM, pH 5,8 con alta aireación). Se probaron también variantes de dichas condiciones para detectar factores relevantes que pudieran influir en la expresión de *sseK1*. Se observó un pequeño pero significativo impacto ($P < 0,01$ o $P < 0,05$; **Figura R2.3B**) en la expresión de *sseK1* al cambiar la osmolaridad del medio de inducción de la SPI1, y la máxima expresión se obtuvo con la concentración original de NaCl (0,3 M). La aireación no resultó ser un factor relevante, pero sí se observó una represión significativa ($P < 0,01$) de la expresión de *sseK1* al añadir al medio butirato, un producto de la fermentación que se encuentra en el intestino y que se sabe que baja la expresión de la SPI1 (**Figura R2.3C**). Curiosamente, mientras que la baja concentración de Mg^{++} del medio de inducción de la SPI2 (LPM) contribuyó positivamente a la expresión de *sseK1*, el pH ácido tuvo un impacto negativo (**Figura R2.3D**), por lo que la expresión máxima se observó en medio LPM con baja concentración de Mg^{++} pero a pH 8,4 ($P < 0,01$). Una conclusión general de estos experimentos es que la expresión de *sseK1* no está restringida a las condiciones de inducción de la SPI1 o de la SPI2 sino que se observa coexpresión de este gen con ambas islas.

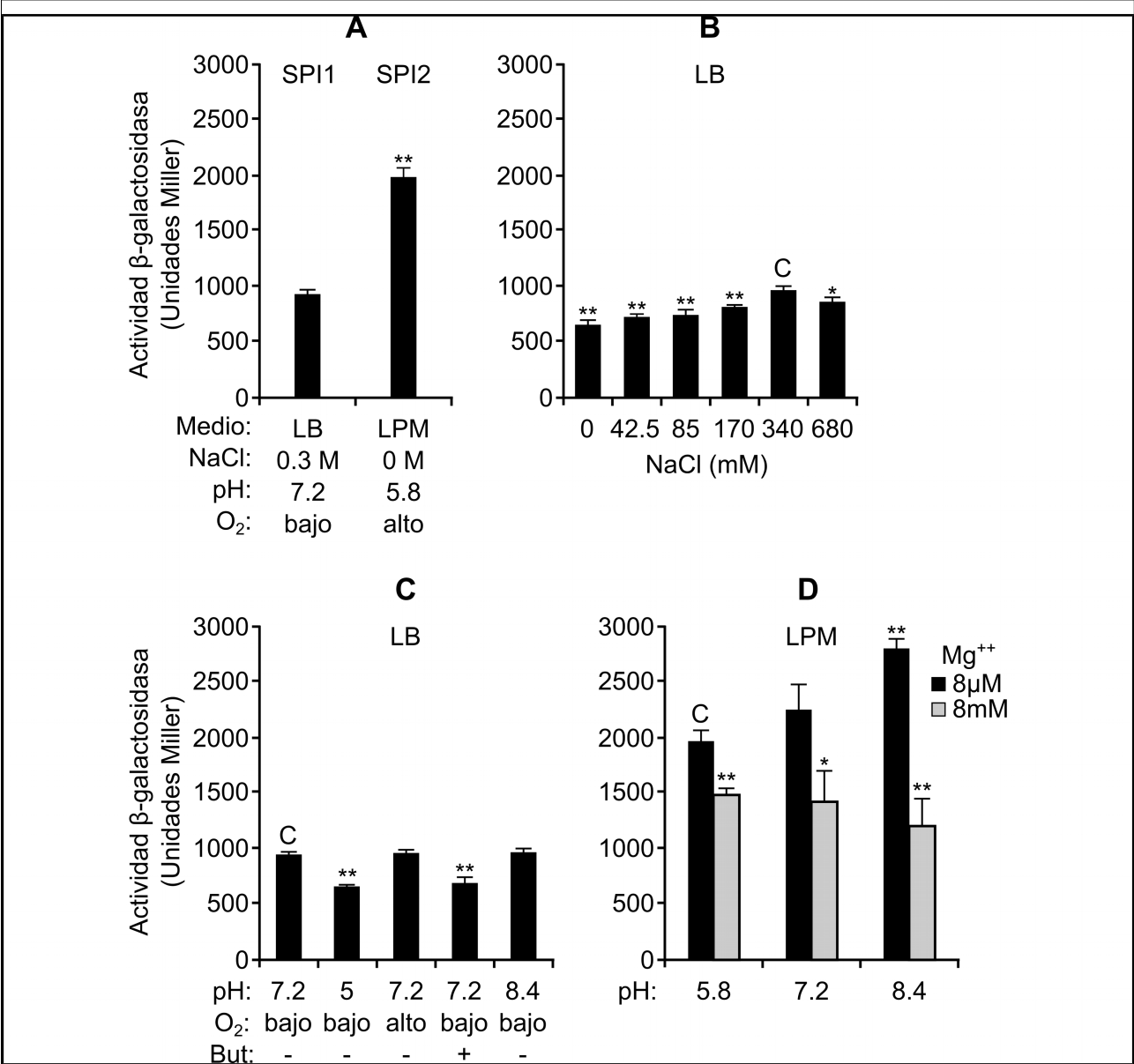


Figura R2.3: Expresión de *sseK1* en diferentes medios de cultivo. La actividad β-galactosidasa se midió a partir de cultivos de toda la noche de una estirpe de *Salmonella enterica* que llevaba una fusión traduccional *sseK1::lacZ* en el cromosoma. **(A)** Las bacterias se cultivaron toda la noche a 37°C en LB 0,3 M de NaCl sin agitación (SPI1) o en LPM con agitación (SPI2). **(B)** Se usaron diferentes concentraciones de NaCl para probar el papel de la osmolaridad en la expresión de *sseK1* en condiciones de inducción de SPI1. **(C)** Se probó el efecto del pH, la hipoxia y el butirato sobre la expresión de *sseK1* en LB. **(D)** Se midió la actividad después del crecimiento en LPM con diferentes pH y concentraciones de Mg⁺⁺, como se indica. Se representan las medias y las desviaciones típicas de tres medidas independientes de actividad β-galactosidasa. Se señalan con asteriscos las diferencias estadísticamente significativas en una prueba de t de Student: valores de *P*: **P* < 0,05; ***P* < 0,01. C indica la referencia para la comparación estadística.

Estos resultados de expresión son compatibles con la posible translocación de SseK1 a través tanto del T3SS1 como del T3SS2. Se realizó un análisis detallado de esta posibilidad usando dos tipos de fusiones SseK1-CyaA' diferentes: la primera se preparó en un plásmido y su expresión estaba bajo control de un promotor constitutivo; la segunda se generó en el cromosoma bajo el control del promotor nativo de *sseK1* siguiendo el método puesto a punto en el **Capítulo 1** de esta

tesis. En ambos casos la proteína SseK1 se fusionó al dominio catalítico de la adenilato ciclasa dependiente de calmodulina de *B. pertussis*. Se usaron estirpes de *Salmonella* (silvestre y mutantes carentes de los T3SSs) que expresaban la fusión para infectar tres tipos de células de mamíferos: células epiteliales humanas HeLa, macrófagos de ratón RAW264.7 y fibroblastos de rata NRK-49F. Se analizó la translocación de la proteína de fusión a las células hospedadoras 1, 2, 4, 8 y 16 horas tras la infección midiendo la concentración de AMPc en los cultivos celulares (**Figura R2.4**). Todas las infecciones se llevaron a cabo usando bacterias invasivas (cultivadas en condiciones de inducción de la SPI1) excepto las infecciones largas (4-16 horas) de células RAW264.7 para evitar la inducción rápida de muerte por piroptosis de los macrófagos por las bacterias invasivas (Fink & Cookson, 2007). Curiosamente, se observaron patrones diferentes de translocación dependiendo del tipo de célula hospedadora y del tipo de fusión. Las conclusiones principales son: (i) La translocación de SseK1 a tiempos cortos (1 y 2 h después de la infección) sólo se observa cuando la fusión se expresa constitutivamente desde un plásmido (**Figura R2.4A, C, E**) y es dependiente del T3SS1 en los tres tipos celulares. (ii) Cuando sseK1 se expresa desde su propio promotor en el cromosoma (**Figura R2.4B, D, F**) la translocación de SseK1 se produce a partir de las 4 h después de la infección en células epiteliales y fibroblastos, y a partir de las 8 h después de la infección en macrófagos. En estas condiciones, la translocación en células HeLa depende del T3SS1, la translocación en RAW264.7 depende del T3SS2, y la translocación en NRK-49F se produce a través de ambos sistemas.

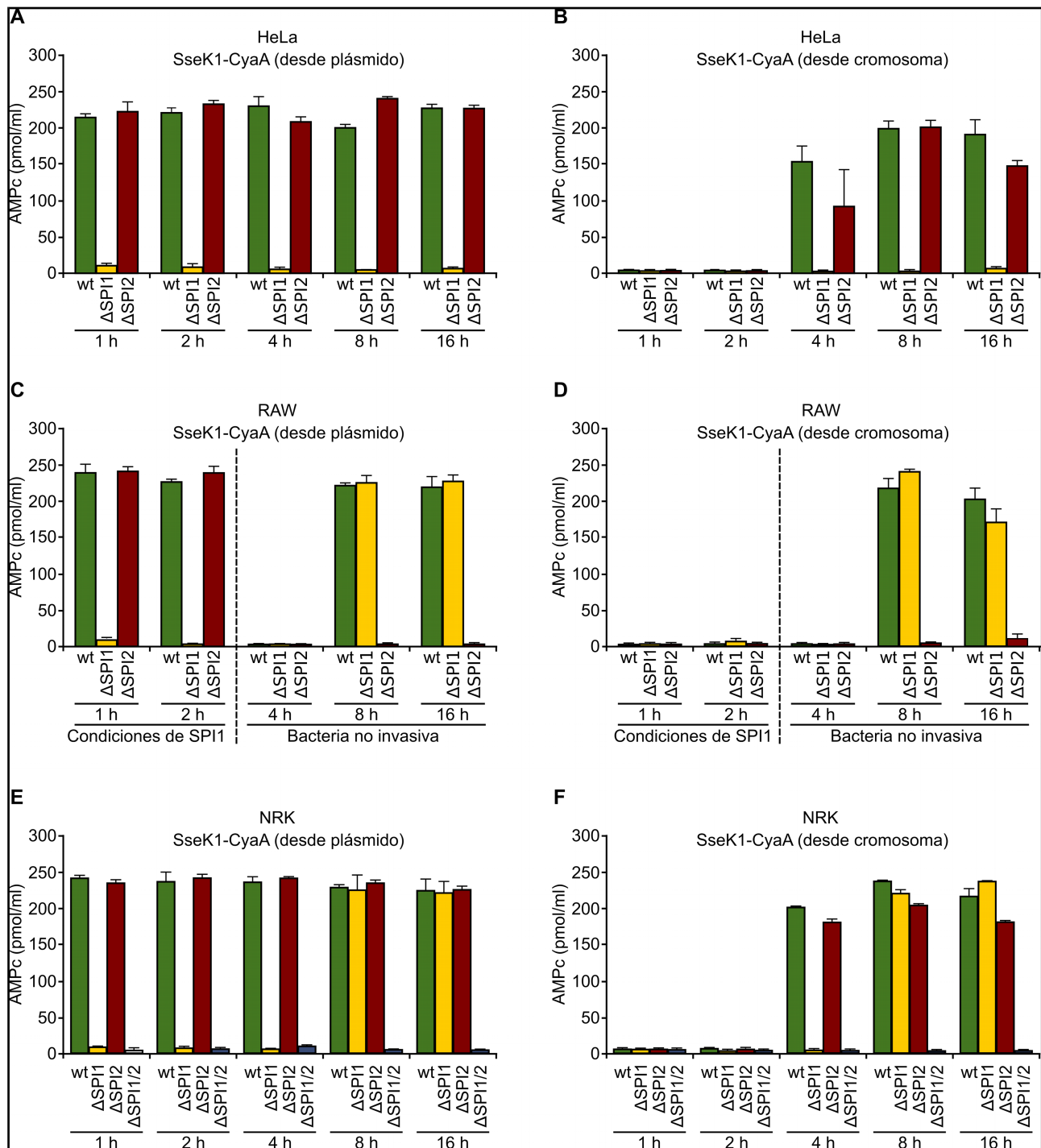


Figura R2.4: Translocación de SseK1 en células de mamíferos. Se infectaron tres tipos celulares de mamíferos distintos, células epiteliales humanas HeLa, (A,B), macrófagos de ratón RAW264.7 (C,D) y fibroblastos de rata NRK-49F, con bacterias derivadas de *S. enterica* serovar Typhimurium 14028 (estirpes silvestre, wt, Δ SPI1, Δ SPI2 y Δ SPI1 Δ SPI2) que portaban un plásmido que expresa la fusión SseK1-CyaA' desde un promotor constitutivo (A,C,E) o la fusión cromosómica SseK1-CyaA' expresada bajo el promotor nativo de *sseK1* (B,D,F). Las bacterias se cultivaron en condiciones de inducción de la SPI1 para la mayoría de las infecciones. Se usaron bacterias no invasivas específicamente para las infecciones de células RAW264.7 durante 4, 8 y 16 h. Para detectar la translocación se midieron los niveles de AMPc 1, 2, 4, 8 y 16 h después de las infecciones. Se representan las medias y desviaciones típicas de experimentos por triplicado.

Regulación de *sseK1* por el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP de manera independiente de SsrB

Se aprovechó la fusión cromosómica *sseK1::lacZ* para buscar factores genéticos que controlasen la expresión de *sseK1*. Se probó el efecto de mutaciones en los genes que codifican reguladores importantes de la virulencia: HilA, HilD, SsrB, PhoP, RcsB y Dam. HilA e HilD son reguladores positivos de la SPI1 (Bajaj et al., 1995; Schechter & Lee, 2001). SsrB es el principal regulador positivo de la expresión de la SPI2 (Cirillo et al., 1998a). Ambas islas están reguladas por PhoP, que actúa como regulador positivo de la SPI2, a través de SsrB, y como regulador negativo de la SPI1, a través de HilA (Bajaj et al., 1996; Bijlsma & Groisman, 2005). RcsB reprime la SPI1 a través de HilD (Mouslim et al., 2004 ; Lin et al., 2008). Dam es una metilasa de adenina que activa la expresión de la SPI1 a través de HilD (López-Garrido & Casadesús, 2010). Además de las mutaciones nulas de todos estos genes también se usaron las mutaciones puntuales *phoQ24* y *rscC54*. Estas mutaciones provocan la activación constitutiva del sistema de dos componentes PhoQ/PhoP y del sistema de fosforilación RcsC/RcsD/RcsB, respectivamente. Se midió el nivel de expresión de *sseK1::lacZ* en cultivos líquidos de bacterias cultivadas en condiciones de inducción de la SPI1 (**Figura R2.5A**) o de la SPI2 (**Figura R2.5B**). Los resultados sugieren que PhoP es un regulador positivo de la expresión de *sseK1* ya que se observó una disminución significativa en la expresión de *sseK1* en el mutante nulo *phoP* bajo condiciones de inducción de SPI2 ($P < 0,01$).

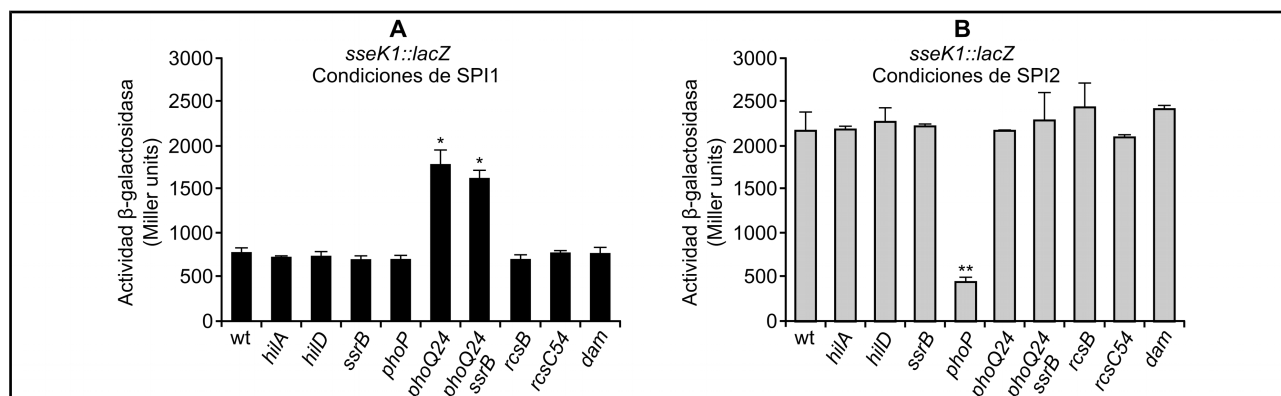


Figura R2.5: Análisis de la regulación positiva de la expresión de *sseK1* por el sistema PhoQ/PhoP mediante actividad β-galactosidasa. Se midió la actividad β-galactosidasa a partir de cultivos, en condiciones de inducción de la SPI1 (A) y de la SPI2 (B), de diferentes estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium: 14028 (wt), mutantes nulos (*hilA*, *hilD*, *ssrB*, *phoP*, *rcsB* y *dam*) y mutantes que activan constitutivamente el sistema PhoQ/PhoP y el sistema Rcs (*phoQ24* y *rcsC54*, respectivamente) que portaban la fusión traduccional *sseK1::lacZ*. Se investigó el papel de SsrB en la regulación por PhoP mediante el doble mutante *phoQ24 ssrB*. Se muestran las medias y las desviaciones típicas de tres medidas independientes de la actividad β-galactosidasa. Se señalan mediante asteriscos las diferencias estadísticamente significativas, entre la estirpe silvestre y mutantes, para los siguientes valores de *P* en la prueba t de Student: **P* < 0,05; ***P* < 0,01

Esta conclusión se confirmó con el efecto positivo en la expresión de *sseK1* en condiciones de inducción de la SPI1 de la mutación activadora *phoQ24* (*P* < 0,05). También se evaluó el efecto de la mutación *phoP* en los niveles de proteína SseK1 usando una fusión 3xFLAG en el cromosoma (Figura R2.6A). El efecto a este nivel fue más acusado, lo que sugiere algún tipo de regulación postraduccional además de la modulación de la transcripción que se espera para PhoP. No se detectaron efectos para las mutaciones que afectan a los otros reguladores que se analizaron en este experimento, incluyendo SsrB. La eliminación de SsrB no tuvo ningún impacto significativo sobre la expresión de *sseK1* ni siquiera en un fondo genético *phoQ24* (Figura R2.6B), lo cual indica que la activación de la expresión de *sseK1* por el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP es independiente de SsrB.

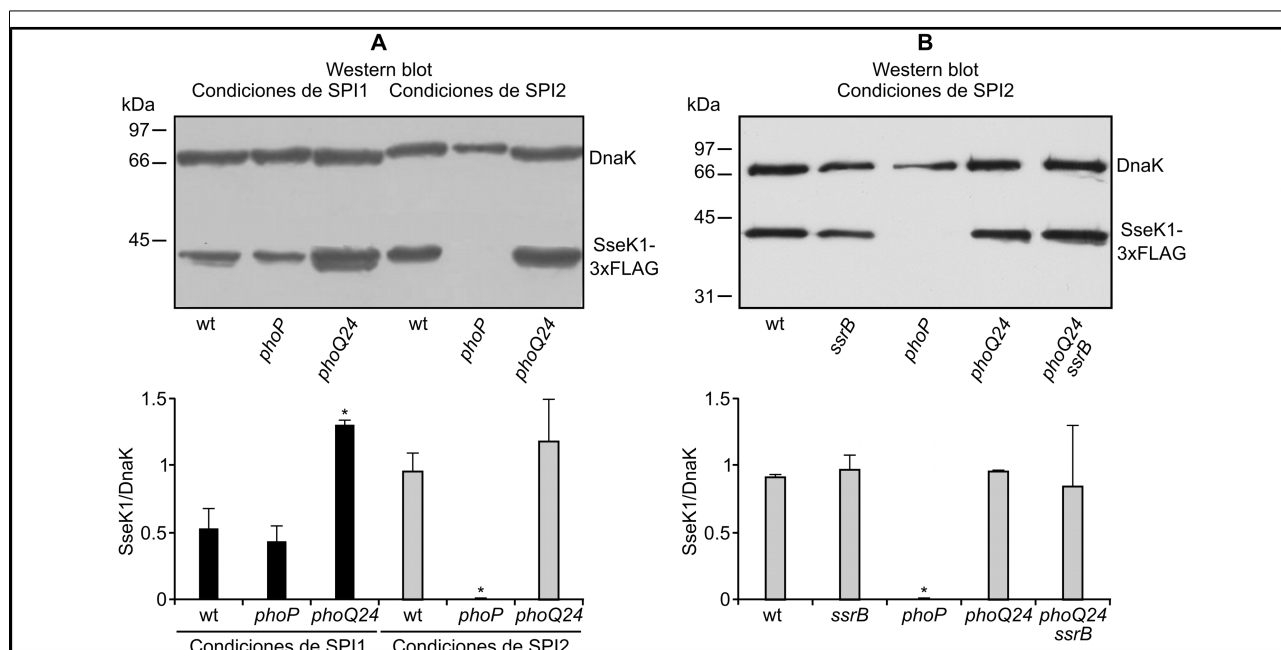


Figura R2.6: Análisis de la regulación positiva de la expresión de *sseK1* por el sistema PhoQ/PhoP mediante inmunoblot. Se evaluó el efecto del sistema PhoQ/PhoP (**A**) y de SsrB (**B**) sobre la expresión de *sseK1* a nivel de proteína mediante inmunoblot usando para ello estirpes que expresan SseK1-3xFLAG. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-FLAG, para detectar la proteína de fusión, y policlonales anti-DnaK, para el control de carga. Se muestran juntos un gel y el correspondiente diagrama de cuantificación de bandas (relación SseK1/DnaK) obtenido a partir de los datos de dos geles. Se señalan mediante asteriscos las diferencias estadísticamente significativas, entre la estirpe silvestre y mutantes, para los siguientes valores de *P* en la prueba t de Student: **P* < 0,05; ***P* < 0,01.

Regulación directa de la expresión de *sseK1* por PhoP

A continuación hicimos el razonamiento de que si PhoP regula la expresión de *sseK1* de manera independiente de SsrB tal vez fuera un regulador directo de ese gen. Para sustentar esta hipótesis se analizó la región promotora de *sseK1* buscando un posible sitio de unión a PhoP. De acuerdo con un análisis global previo llevado a cabo en la estirpe SL1344 de *S. enterica* serovar Typhimurium (Kröger *et al.*, 2012), el sitio de inicio de la transcripción de *sseK1* es una T localizada 40 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio de la traducción. Visualmente detectamos la presencia de posibles motivos consenso -10 y -35 para la transcripción dependiente de $\sigma 70$ con la distancia apropiada entre ellos (**Figura R2.7**). Además se encontró una secuencia semejante a la secuencia consenso del sitio de unión de PhoP (T/G)GTTTA-NNNNN-(T/G)GTTTA (donde N es cualquier nucleótido) en la posición -75/-59, relativa al sitio de inicio de la transcripción. Otro posible medio sitio de unión, aunque menos parecido al consenso, se localizó en la posición -53/-48.

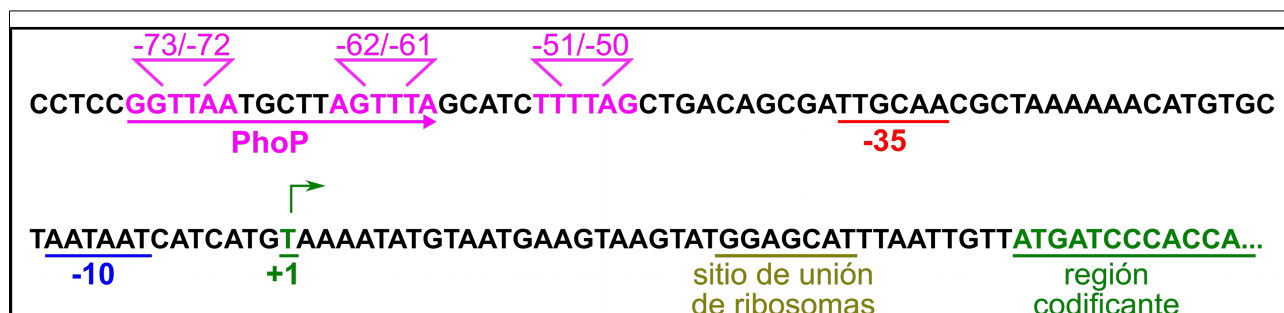


Figura R2.7: Análisis de la región promotora de *sseK1*. Se muestra la secuencia alrededor del sitio de inicio de la transcripción (+1). Se indican, el inicio de la secuencia codificante, el sitio de unión a ribosomas y la secuencia consenso para la transcripción dependiente del factor σ^{70} (-10 y -35). Los posibles motivos de unión de PhoP se indican en rosa, y la caja de unión a PhoP está subrayada con una flecha

Se probó el papel de estas regiones en el control de la expresión de *sseK1* usando dos plásmidos diferentes: pIC552 y pSB377. Se clonó en estos plásmidos un fragmento de ADN con el promotor y la región 5' no traducida de *sseK1*, desde -500 a +40, para generar una fusión transcripcional *lacZ* (**Figura R2.8A**) y una fusión transcripcional bioluminiscente *lux*, respectivamente (**Figura R2.8B**). La expresión de las fusiones en los fondos genéticos silvestre y *phoP* indicó que la región clonada contenía las señales necesarias para la expresión de *sseK1* regulada por PhoP. Para evaluar la relevancia de los posibles sitios de unión de PhoP se obtuvieron tres mutantes independientes en el plásmido de la fusión *lux*. Cada mutante se construyó cambiando las TT conservadas en el centro de los posibles medios sitios de unión de PhoP por CC (**Figura R2.5**). Mientras que la mutación en la posición -51/-50 no tuvo efectos sobre la expresión de la fusión, la alteración de los motivos -62/-61 o -73/-72 eliminó completamente la regulación de la fusión por PhoP, tanto en condiciones de inducción de la SPI1 (**Figura R2.8C**) como en condiciones de inducción de la SPI2 (**Figura R2.8D**). Estos resultados sugieren que la región -75/-59 constituye una caja completa de unión a PhoP.

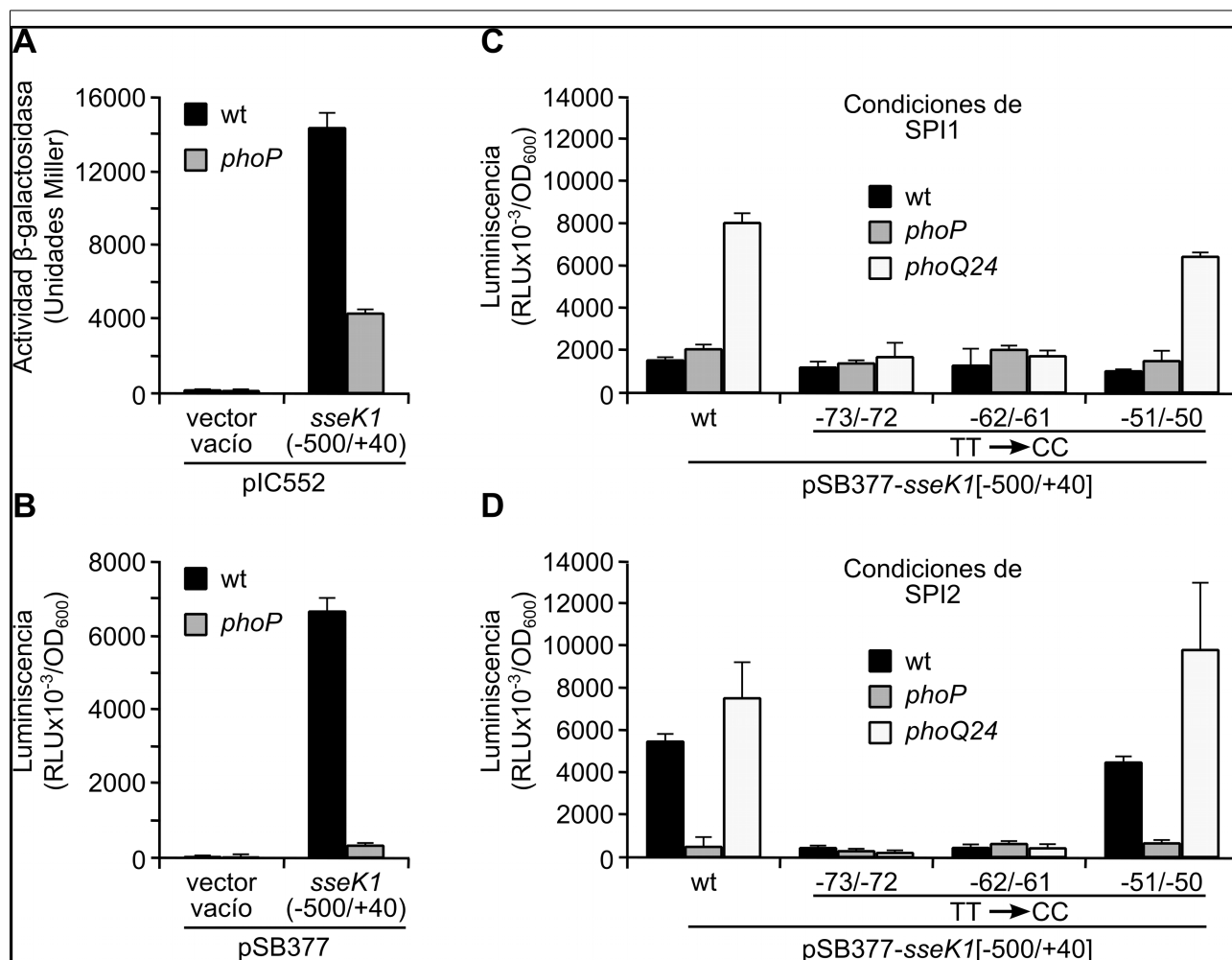
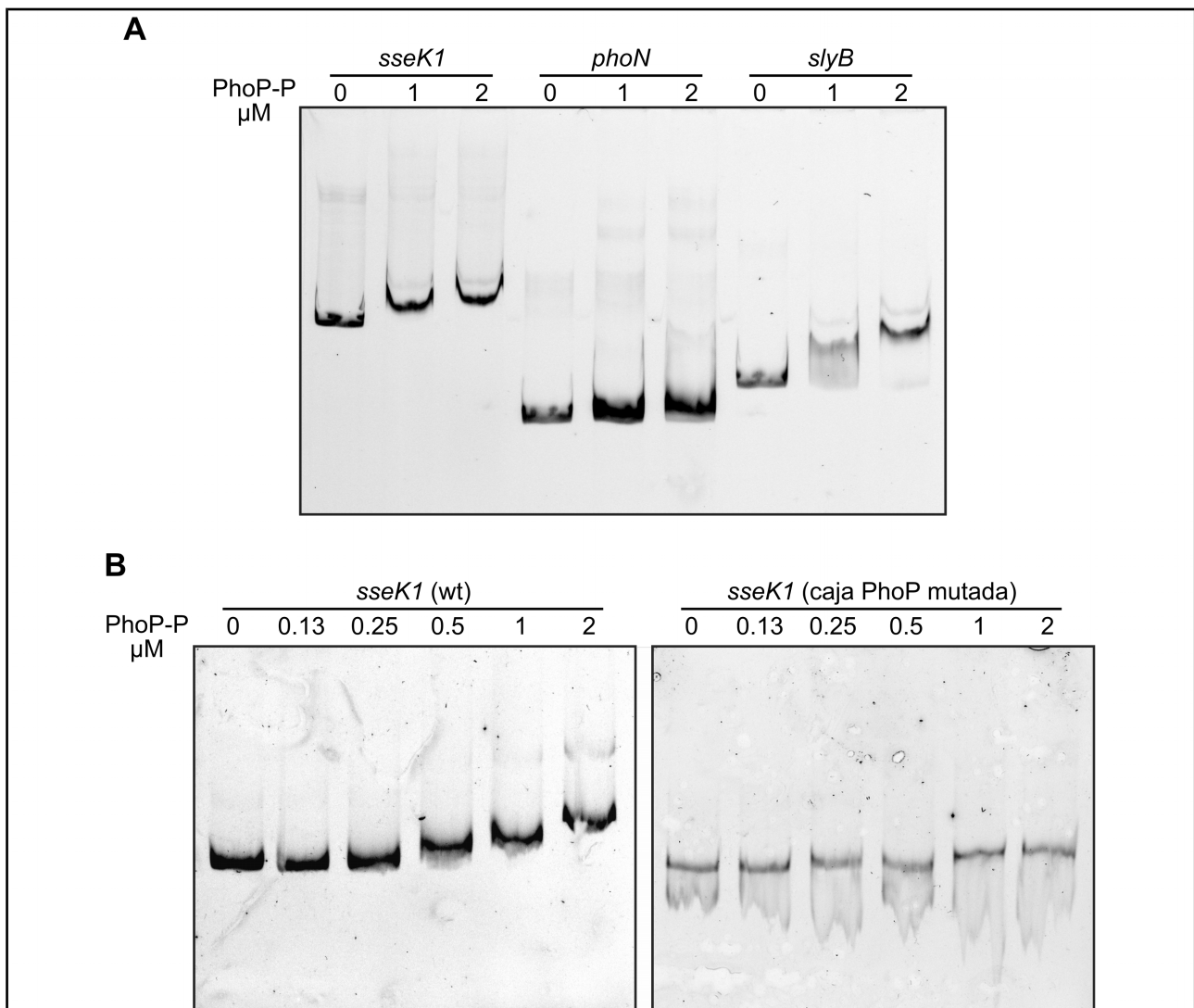


Figura R2.8: Identificación de la caja de unión a PhoP en el promotor de *sseK1*. Se insertó un fragmento de ADN con el promotor y la región 5' no traducida de *sseK1* (-500/+40) en el plásmido pIC552, para generar una fusión transcripcional *lacZ* (A), y en el plásmido pSB377, para generar una fusión transcripcional *luxCDABE* (B). Se introdujeron estos plásmidos, y los correspondientes vectores vacíos en la estirpe silvestre y en el mutante nulo *phoP* de *S. enterica* serovar Typhimurium y se midió la actividad β -galactosidasa y la luminiscencia, respectivamente, de cultivos crecidos hasta fase estacionaria en LPM líquido a pH 5,8. También se midió la luminiscencia de las estirpes silvestre, *phoP* y *phoQ24* con derivados del plásmido pSB377 con la región promotora de *sseK1* o variantes con las mutaciones indicadas y que se cultivaron en condiciones de inducción de la SPI1 (C) o condiciones de inducción de la SPI2 (D). RLU: Unidades relativas de luz.

Finalmente se utilizó un ensayo de cambio de movilidad electroforética para analizar la unión de PhoP al promotor de *sseK1*. Se usaron los promotores de *slyB* y *phoN* como controles positivo y negativo, respectivamente. Para estos experimentos se empleó la proteína PhoP-His₆ fosforilada in vitro así como fragmentos de ADN con la regiones promotoras de interés amplificadas por PCR. Como se observa en la **Figura R2.9A**, PhoP fue capaz de unirse a los promotores de *slyB* y *sseK1* pero no al promotor de *phoN*. Además las mutaciones en las posiciones -61/-62 y -72/-73 impidieron la unión de PhoP (**Figura R2.9B**). Estos resultados proporcionan un apoyo adicional a la hipótesis de que la región -75/-59 es la caja de unión de PhoP.



Figura_R2. 9: Interacción directa de PhoP fosforilada con la región promotora de *sseK1*. His₆-PhoP purificada se fosforiló *in vitro* con acetil-fosfato. **(A)** Se amplificaron por PCR fragmentos de ADN de la región promotora de *sseK1* (-500/+40), *phoN* y *slyB* usando oligonucleótidos marcados con fluorocromos e incubados con la concentración indicada de His₆-PhoP fosforilada (PhoP-P). Se usó un ensayo de cambio de movilidad electroforética para detectar la unión. **(B)** Se amplificaron por PCR fragmentos de ADN de la región promotora de *sseK1* (-300/-1) silvestre y con mutaciones puntuales T → C en las posiciones -73, -72, -62 y -61 (caja PhoP mutante), usando oligonucleótidos marcados con fluorocromos e incubados con la concentración indicada de His₆-PhoP fosforilada (PhoP-P). Se usó un ensayo de cambio de movilidad electroforética para detectar la unión.

Expresión de *sseK1* dentro de macrófagos

La fusión transcripcional *sseK1::lux* descrita anteriormente se empleó también para estudiar la expresión de *sseK1* durante la infección de macrófagos RAW264.7. Se usaron estirpes de *Salmonella* que expresaban la fusión para infectar los macrófagos en placas de 96 pocillos. Como se observa en la **Figura R2.10**, la luminiscencia por bacteria se incrementó a las 4 y 8 horas de la infección con respecto a las 2 horas de la infección. Esto sugiere que la expresión de *sseK1* se induce, junto con el T3SS2, en respuesta a señales intravacuolares. En cambio no se observó

inducción intracelular en el mutante nulo *phoP*, lo que supone un apoyo adicional a la idea de que PhoP es un regulador positivo de la expresión de *sseK1*.

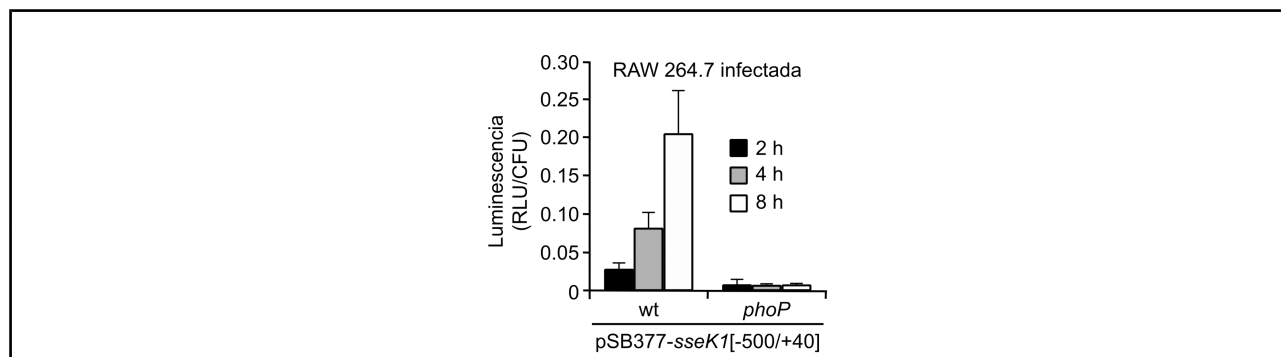


Figura R2.10: Expresión intracelular de *sseK1* dependiente de PhoP. Se cultivaron durante 24 h en LB a 37°C con aireación (en condiciones no invasivas) dos estirpes de *S. enterica* serovar Typhimurium (silvestre y mutante *phoP*) que llevaban un plásmido que expresa una fusión transcripcional *sseK1::luxCDABE* (pSB377-*sseK1*[-500/+40]). Estas bacterias se usaron para infectar macrófagos de ratón RAW264.7 y se midió la luminiscencia producida por las bacterias intracelulares 2, 4 y 8 h tras la infección.

Capítulo 3: Estudio preliminar del efecto de SseK1 en la célula hospedadora

Una vez estudiada la regulación y la translocación de SseK1 nos interesaba investigar las consecuencias de la presencia de este efector en las células hospedadoras. En este último capítulo de la tesis se presentan los resultados de las dos aproximaciones que hemos empleado para abordar ese objetivo. (i) La búsqueda de proteínas del hospedador capaces de interaccionar con SseK1. (ii) El análisis del efecto global a nivel transcriptómico de la presencia de SseK1 en la célula hospedadora.

Escrutinio genético para la identificación de proteínas humanas dianas de SseK1

El sistema del doble híbrido es un ensayo basado en un factor de transcripción que posee dos dominios separables, uno de unión al ADN (DBD) y otro de activación de la transcripción (AD). El gen de interés se expresa como una fusión al DBD (proteína cebo), mientras que otro gen o ADNc se expresa como una fusión al AD (proteína presa). Si se produce una interacción entre la proteína cebo y la proteína presa, ocurrirá un acercamiento entre los dos dominios del factor de transcripción, permitiendo de esta manera la transcripción de un grupo de genes indicadores (**Figura R3.1**). Cuando se quiere realizar un escrutinio se fusiona la proteína de interés al DBD y productos de una genoteca de ADNc se fusionan al AD. Este sistema nos permite el acceso inmediato a genes que codifican proteínas que interaccionan con la proteína de interés.

Para la identificación de proteínas humanas dianas de SseK1 se utilizó el sistema de doble híbrido en la estirpe L40 de *Saccharomyces cerevisiae*, que cuenta con el sitio de reconocimiento del factor de transcripción LexA para regular la expresión de los marcadores *his3* y *lacZ* (**Figura R3.1**) ([Shirakawa et al., 2009](#)). Para generar una fusión entre SseK1 y el dominio de unión al ADN de LexA se clonó la región codificante del gen *sseK1* en el plásmido pLEX10. En experimentos preliminares se determinó que la fusión DBD-SseK1 no activaba por sí sola los genes indicadores.

El escrutinio se llevó a cabo transformando la estirpe L40/pLEX10-SseK1 con una genoteca de ADNc, procedente de ARN poliadenilado de células Jurkat, construida en el plásmido pGAD1318 en fusión con la región activadora del factor de transcripción Gal4, y sembrando los transformantes en medio DO -Trp -Leu -His. La presencia de los plásmidos pLEX10 y pGAD1318 complementa las auxotrofías para triptófano y leucina, respectivamente, de L40. Por otro lado, si una proteína

codificada en la genoteca interacciona con SseK1 se espera que la estirpe reportera pueda crecer en medio selectivo sin His y tenga actividad β -galactosidasa.

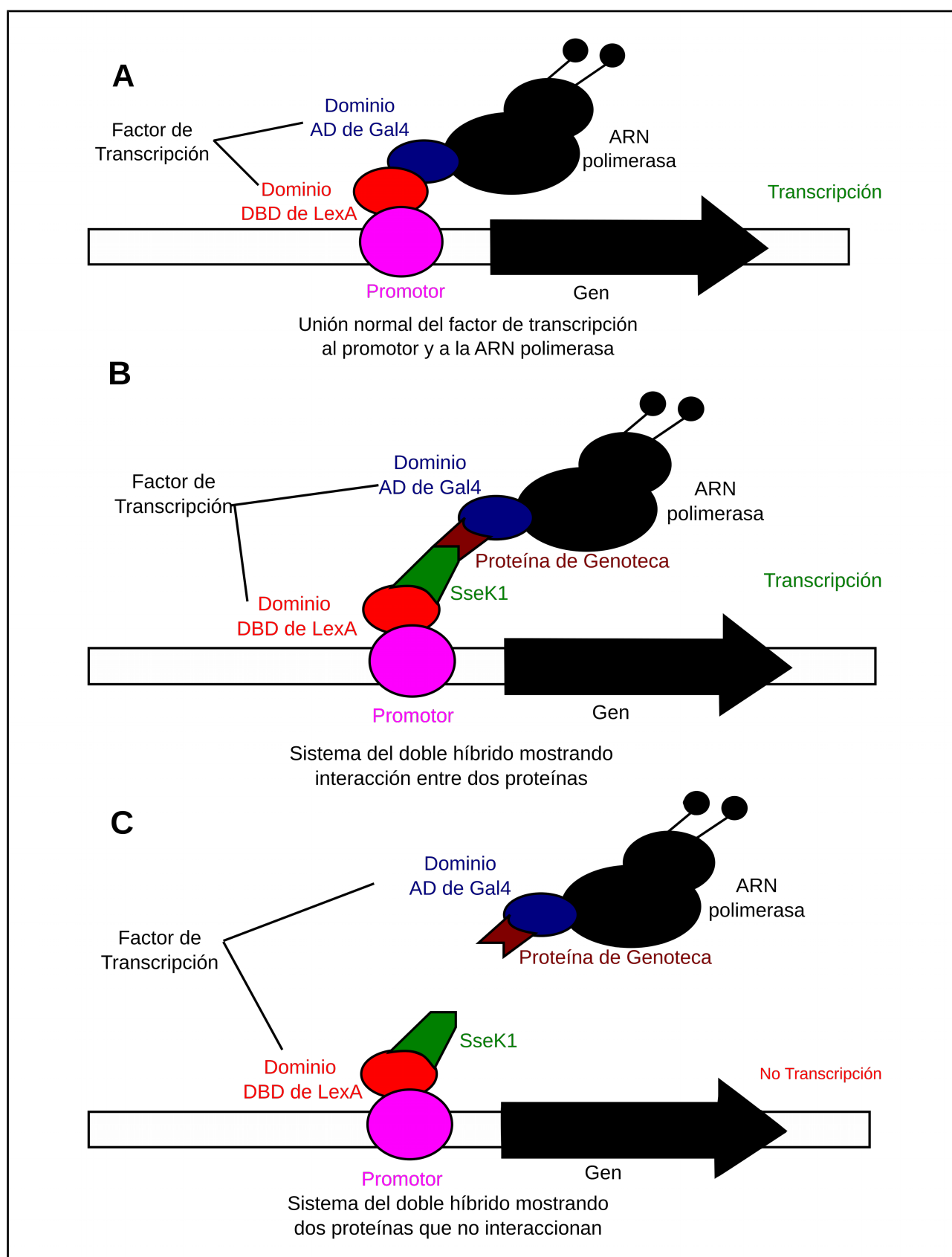


Figura R3.1: Esquema del principio básico del sistema del doble híbrido. (A) La unión del factor de transcripción a la secuencia adecuada activa la transcripción de un gen indicador (B) La interacción entre las proteínas cebo (SseK1) y presa permite la reconstrucción del factor de transcripción y la expresión del gen indicador. (C) Cuando no se produce interacción entre las proteínas cebo y presa no se puede reconstruir el factor de transcripción y no se expresa el gen indicador.

Se obtuvieron 878 clones con capacidad de crecer en medio selectivo sin His de un total de 7×10^5 clones escrutados. De ellos, 180 mostraron también actividad β -galactosidasa (azules en el ensayo con X-Gal). Se rescataron los plásmidos de 166 clones positivos para ambos marcadores.. La reintroducción de algunos de esos plásmidos en las levaduras L40/pLEX10-SseK1 y L40/pLEX10 permitió confirmar inicialmente 11 candidatos. Se determinaron las secuencias adyacentes al promotor Gal4 de los plásmidos derivados de pGAD1318 que portaban esos 11 clones positivos. El análisis de estas secuencias reveló que la mayoría de esos plásmidos contenía el ADNc del gen TBCB. Ensayos de amplificación mediante PCR con cebadores específicos para el ADNc de TBCB indicaron que otros 106 candidatos eran portadores también de un fragmento de este gen. El resto de los candidatos que se confirmaron en levaduras se identificaron mediante secuenciación. En la **Tabla R3.1** se presenta un resumen de los resultados del escrutinio.

Tabla R3.1: Genes humanos identificados en el escrutinio de doble híbrido con SseK1

Número de candidatos	Gen	Descripción del producto	Aminoácidos incluidos
116	TBCB	<i>Tubulin-folding cofactor B</i>	1-244 4-244 29-244
7	ZBTB16	<i>Zinc finger and BTB domain-containing protein 16</i>	420-673 448-673 552-673
3	H3F3B	<i>Histone H3.3</i>	1-136 40-136
1	H3F3A	<i>Histone H3.3</i>	18-136
1	CENPA	<i>Histone H3-like centromeric protein A</i>	1-140
1	HIRIP3	<i>HIRA-interacting protein 3</i>	340-556
1	XRCC6	<i>X-ray repair cross-complementing protein 6</i>	335-609

Los dos genes de los que se obtuvieron mayor número de candidatos, TBCB y ZBTB16, fueron también aquellos cuyos productos mostraron interacciones más fuertes con SseK1, a juzgar por el crecimiento en medio sin His y por la intensidad del color azul en presencia de X-Gal (**Figura R3.2**).

El producto del gen TBCB es el cofactor B de unión a tubulina. Se une específicamente a α -tubulina y coopera con TBCE en el plegamiento de α -tubulina y en la disociación de tubulina (Carranza *et al.*, 2013; Serna *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 1997).

El gen ZBTB16, también llamado PLZF, codifica un factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas con dedos de zinc semejantes a Krüppel cuyos miembros están implicados en la regulación de varios procesos celulares incluyendo la proliferación celular, la apoptosis y la

diferenciación (Liu *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2008). Curiosamente, ZBTB16 tiene también una función citosólica formando parte del complejo ubiquitín ligasa ZBTB16-Cullin3-Roc1 que interviene en la regulación de la autofagia (Zhang *et al.*, 2015a).

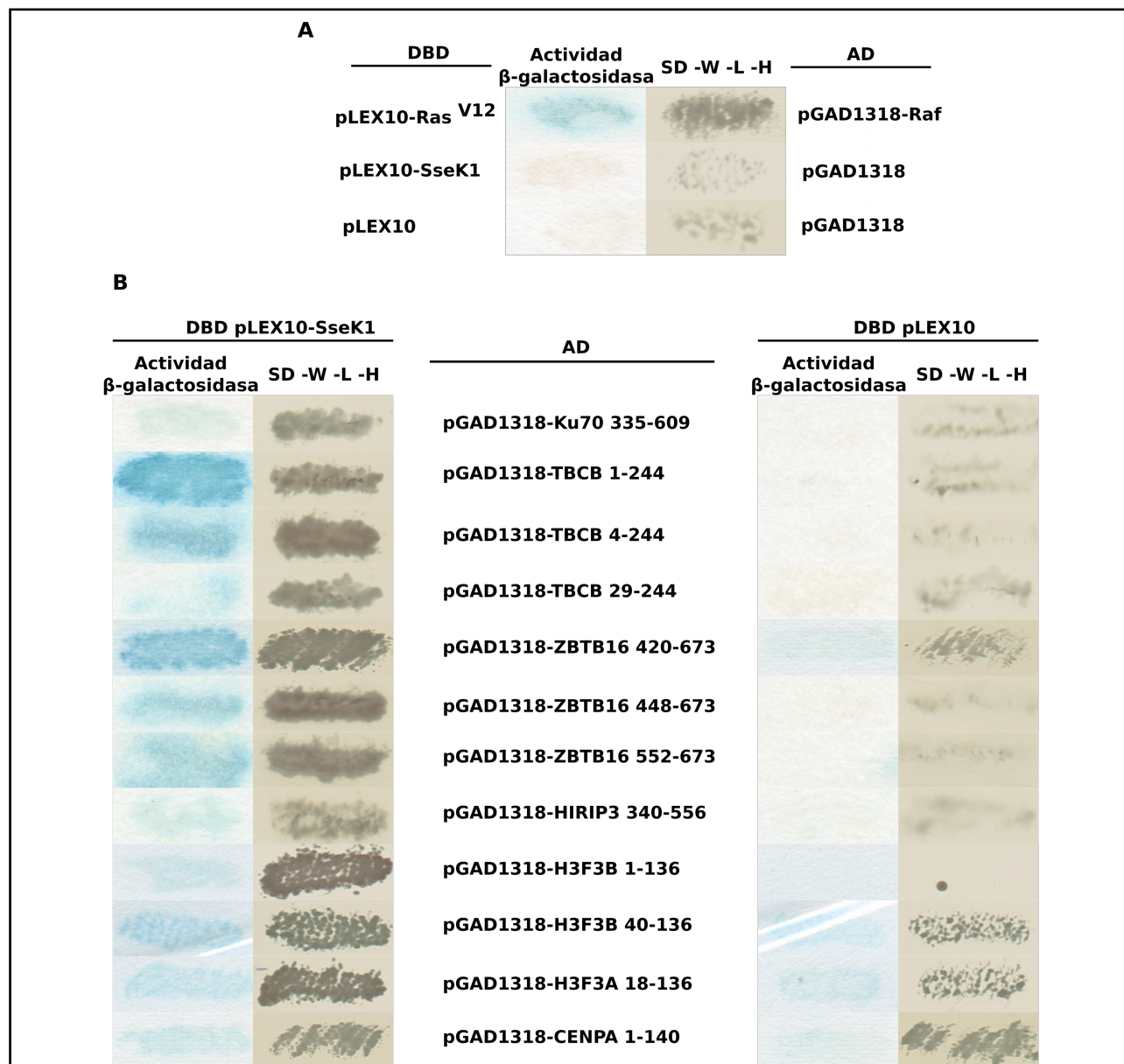


Figura R3.2: Análisis de las interacciones de SseK1 con proteínas humanas mediante el sistema del doble híbrido en levaduras. Se muestra el crecimiento en medio selectivo sin His y la actividad β -galactosidasa de los candidatos que dieron positivo en el escrutinio y que se confirmaron reconstruyendo la estirpe de levadura portadora de pLexA-SseK1 (o pLexA vacío como control) con los plásmidos pGAD1318 correspondientes previamente aislados y transferidos a la estirpe HB101 de *E. coli*. Se usó la interacción entre Raf y Ras^{V12} como control positivo.

La mayoría de los candidatos restantes están implicados en la organización de la cromatina. Así, los genes H3F3A y H3F3B codifican un producto idéntico que es una variante de la histona H3 denominada H3.3. Esta variante se describió como asociada preferentemente a zonas de la cromatina transcripcionalmente activas pero también está enriquecida en los centrómeros y

telómeros (Szenker *et al.*, 2011). CENPA codifica otra variante de la histona H3 que es un determinante clave para la identidad del centrómero y para el ensamblaje del cinetocoro (Allshire & Karpen, 2008). El producto de HIRIP3 (HIRA-interacting protein 3) interacciona con las histonas H2B y H3 (Lorain *et al.*, 1998) y es un sustrato de la kinasa CK2 con un posible papel en el metabolismo de la cromatina (Assrir *et al.*, 2007).

Por último, el gen XRCC6 (Ku70) codifica la subunidad p70 del complejo nuclear p70/p80. Este complejo está implicado en la reparación del ADN, el mantenimiento de los telómeros y la señalización del daño en el ADN (Fell & Schild-Poulter, 2015).

En la **Tabla R3.2** se ofrecen más datos y referencias sobre los candidatos obtenidos.

Tabla R3.2: Análisis de ontología génica de los candidatos obtenidos en el escrutinio de doble híbrido con SseK1

Gen	Función	Procesos	Localización
ZBTB16	-Represor transcripcional (Ivins <i>et al.</i> , 2003)	-Especificación del patrón anterior/posterior -Apoptosis (Koken <i>et al.</i> , 1997) -Desarrollo del cartílago (Koken <i>et al.</i> , 1997) -Desarrollo del sistema nervioso central (Reid <i>et al.</i> , 1995) -Morfogénesis embrionaria -Especificación de patrón embrionario -Hematopoyesis (Reid <i>et al.</i> , 1995) -División asimétrica de células madres de línea germinal masculina -Desarrollo mesonefros (Reid <i>et al.</i> , 1995) -Diferenciación célula mielóide (Koken <i>et al.</i> , 1997) -Regulación negativa de la proliferación celular -Regulación negativa de la transcripción por ARN pol II (Ivins <i>et al.</i> , 2003) -Regulación positiva de la diferenciación de células NK T -Regulación positiva de la diferenciación de los condrocitos (Liu <i>et al.</i> , 2011) -Regulación positiva de la diferenciación de las células grasas (Liu <i>et al.</i> , 2011) -Regulación positiva de la osificación (Liu <i>et al.</i> , 2011) -Regulación positiva de la transcripción (Liu <i>et al.</i> , 2011)	-Cuerpos de leucemia promielocítica (Koken <i>et al.</i> , 1997) -Citosol -Núcleo (Reid <i>et al.</i> , 1995; Thirkettle <i>et al.</i> , 2009) -Complejo represor de la transcripción (Ivins <i>et al.</i> , 2003)
TBCB	-Proteína de unión (Lim <i>et al.</i> , 2006a; Wang <i>et al.</i> , 2005)	-Plegamiento post-traduccional de novo de proteínas -Diferenciación celular -Desarrollo del sistema nervioso	-Citoplasma -Microtúbulos (Watanabe <i>et al.</i> , 1996) -Nucleoplasma
Ku70	-Actividad 5'-desoxirribosa-5'-fosfato liasa (Roberts <i>et al.</i> , 2010) -Actividad ADN helicasa dependiente de ATP -Unión a ADN dañado -Unión a ADN de cadena doble (Tuteja <i>et al.</i> , 1994)	-Desenrollamiento del ADN (Tuteja <i>et al.</i> , 1994) -Ligación del ADN (Baumann & West, 1998) -Recombinación del ADN -Reparación del ADN -Respuesta celular a rayos X -Reparación de roturas de doble cadena mediante recombinación no homóloga (Baumann & West, 1998; Ribes-Zamora <i>et al.</i> , 2013; Ting <i>et al.</i> ,	-Citosol -Complejo Ku70:Ku80 (Ribes-Zamora <i>et al.</i> , 2013; Roberts <i>et al.</i> , 2010) -Complejo del límite de los telómeros (O'Connor <i>et al.</i> , 2004) -Complejo de unión de extremos

	<ul style="list-style-type: none"> -Contribuye a la unión de las dos cadenas teloméricas (Bianchi & de Lange, 1999; Chai <i>et al.</i>, 2002) -Regulación de la transcripción (Kim <i>et al.</i>, 2008) 	<ul style="list-style-type: none"> 2005) -Integración de pro virus latentes -Respuesta inmune innata -Regulación de transcripción (Chung <i>et al.</i>, 1996; Kim <i>et al.</i>, 2008; Willis <i>et al.</i>, 2002) -Heterodimerización de proteínas (Ribes-Zamora <i>et al.</i>, 2013) -Regulación de la proliferación celular del músculo liso -Mantenimiento de los telómeros (Ribes-Zamora <i>et al.</i>, 2013; Ting <i>et al.</i>, 2005) 	<ul style="list-style-type: none"> no homólogos (Roberts <i>et al.</i>, 2010) -Complejo del factor de transcripción (Willis <i>et al.</i>, 2002) -Núcleo (Goedecke <i>et al.</i>, 1999) -Membrana
H3F3A/B	<ul style="list-style-type: none"> -Potenciador distal de ARN pol II (Jin <i>et al.</i>, 2009) -Núcleo de unión a ARN pol II (Jin <i>et al.</i>, 2009) -Histona (Kato <i>et al.</i>, 2015) -Unión ADN nucleosomal (Jin <i>et al.</i>, 2009) -Heterodimerización de proteína -Proteína de unión 	<ul style="list-style-type: none"> -Metilación de citosina -Replicación de ADN independiente del montaje del nucleosoma (Tagami <i>et al.</i>, 2004) -Coagulación sanguínea -Desarrollo del cerebro -Metabolismo de proteínas celulares -Silenciamiento de la cromatina en el ADNr -Expresión génica -Silenciamiento génico por ARN -Regulación epigenética de la expresión génica -Montaje del nucleosoma (Kato <i>et al.</i>, 2015; Tachiwana <i>et al.</i>, 2011) -Regulación positiva del crecimiento celular (Schenk <i>et al.</i>, 2011) -Respuesta a hormonas -Transducción de señales mediada por GTPasa pequeñas -Organización de los telómeros (Fingerman <i>et al.</i>, 2007) 	<ul style="list-style-type: none"> -Exosoma extracelular -Cromosoma nuclear (Tagami <i>et al.</i>, 2004) -Telómeros (Wong <i>et al.</i>, 2010) -Nucleosoma (Jin <i>et al.</i>, 2009; Kato <i>et al.</i>, 2015; Tachiwana <i>et al.</i>, 2011) -Nucleoplasma -Núcleo -Complejo proteico
HIRIP3	<ul style="list-style-type: none"> -Proteína de unión (Lorain <i>et al.</i>, 1998) 	<ul style="list-style-type: none"> -Montaje y desmontaje de la cromatina (Lorain <i>et al.</i>, 1998) 	<ul style="list-style-type: none"> -Nucleolo -Núcleo (Assrir <i>et al.</i>, 2007)
CENPA	<ul style="list-style-type: none"> -Unión a ADN -Unión a cromatina (Sullivan <i>et al.</i>, 1994) -Heterodimerización de proteínas -Proteína de unión (Dunleavy <i>et al.</i>, 2009; Foltz <i>et al.</i>, 2009; Hu <i>et al.</i>, 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> -Montaje del nucleosoma -Establecimiento del huso mitótico (Chan <i>et al.</i>, 2009) -Montaje del cinetocoro (Hooser <i>et al.</i>, 2001) -Ciclo celular mitótico -Procesos víricos -Transducción de señales medidas por GTPasa pequeña 	<ul style="list-style-type: none"> -Centrómero (Hooser <i>et al.</i>, 2001) -Citosol -Nucleoplasma -Nucleosoma -Núcleo

Estudio a nivel transcripcional del efecto de SseK1 en células humanas HeLa

En el apartado anterior del presente capítulo se han estudiado las posibles interacciones de SseK1 con proteínas dianas de las células hospedadoras. En el presente apartado se analiza el efecto de SseK1 a nivel transcripcional en células humanas HeLa.

Para este estudio se emplearon dos aproximaciones complementarias:

(i) Comparación del patrón de expresión génica de células HeLa que expresaban establemente SseK1-3xFLAG (transfectadas con pBABEpuro-SseK1-3xFLAG) con el de células control (transfectadas con el vector vacío). La lógica de esta aproximación es que esto podría orientar sobre la función de SseK1 sin la interferencia de otros factores bacterianos que pudieran realizar funciones contrapuestas o redundantes. Se generaron varios transfectantes estables independientes (**Figura R3.3**) y de dos de ellos (clones A4 y B4), así como de las células control, se obtuvieron tres preparaciones independientes de ARN de cada uno para su análisis.

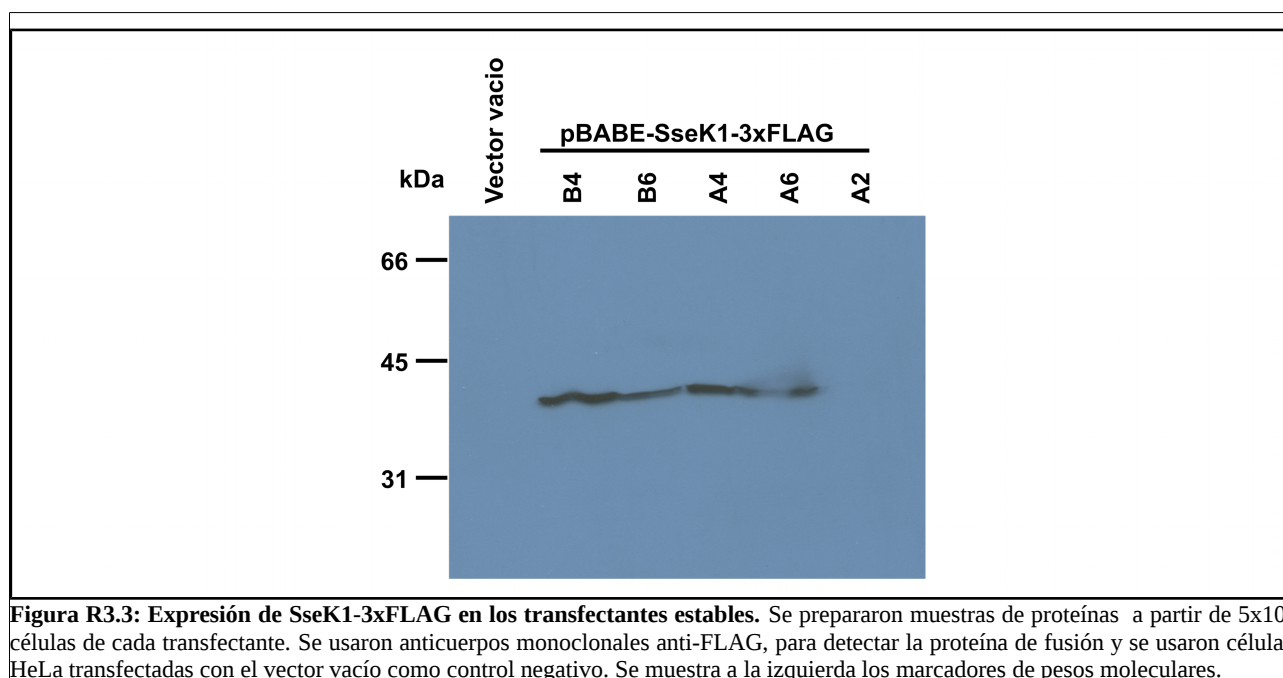


Figura R3.3: Expresión de SseK1-3xFLAG en los transfectantes estables. Se prepararon muestras de proteínas a partir de 5×10^5 células de cada transfectante. Se usaron anticuerpos monoclonales anti-FLAG, para detectar la proteína de fusión y se usaron células HeLa transfectadas con el vector vacío como control negativo. Se muestra a la izquierda los marcadores de pesos moleculares.

(ii) Comparación del efecto en el transcriptoma de células HeLa de la infección con la estirpe silvestre 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium y una mutante con el gen *sseK1* deletado. Para este análisis se extrajo el ARN (tres preparaciones en cada caso) de cultivos de células HeLa no infectadas o infectadas durante 8 h con las estirpes de *Salmonella* mencionadas. El tiempo de infección de 8 h se eligió por ser condiciones en las que se observó máxima translocación de SseK1 a células HeLa, según se vio en el **Capítulo 2**.

El análisis de la expresión génica se realizó en la Unidad de Genómica del Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER) con la plataforma Affymetrix (*GeneChip Human Gene 1.0 ST array*).

Para los análisis posteriores se seleccionaron dos tipos de genes: (i) Genes que aumentasen de manera significativa ($P < 0,05$) en presencia de SseK1 en todas las comparaciones siguientes:

transfectantes A4 / control, transfectantes B4 / control, infectadas con silvestre / no infectadas, infectadas con silvestre / infectadas con mutante *sseK1*. (ii) Genes que disminuyesen significativamente en cada una de las comparaciones anteriores.

Los 18 genes con aumento significativo según esos criterios (excluyendo pseudogenes y ARN no codificantes) se muestran en la **Tabla R3.3**. Por otro lado, con los criterios indicados anteriormente se seleccionaron 14 genes (excluyendo los que no codifican proteínas) que disminuían su expresión debido a *SseK1* (**Tabla R3.4**).

Tabla R3.3: Genes humanos que incrementaron su expresión en presencia de *SseK1*. Se muestran el valor de P y el cambio lineal de la expresión (R)

Gen	Descripción	A4/ Control		B4/ Control		Silvestre/ No infectadas		Silvestre/ <i>sseK1</i>	
		P	R	P	R	P	R	P	R
C19orf71	<i>chromosome 19 open reading frame 71</i>	0,0069	1,33	0,0151	1,28	0,0031	1,33	0,0480	1,18
CLEC14A	<i>C-type lectin domain family 14, member A</i>	0,0012	1,26	0,0076	1,19	0,0042	1,21	0,0241	1,15
DCUN1D5	<i>DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5</i>	0,0026	1,21	0,0077	1,17	0,0007	1,25	0,0071	1,17
FAM153A	<i>family with sequence similarity 153, member A</i>	0,0361	1,34	0,0095	1,48	0,0215	1,22	0,0064	1,28
IER2	<i>immediate early response 2</i>	0,0002	1,58	0,0248	1,22	0,0274	1,15	0,0493	1,13
MMP12	<i>matrix metalloproteinase 12</i>	0,0008	1,31	0,0405	1,14	0,0162	1,24	0,0061	1,30
NAT9	<i>N-acetyltransferase 9 (GCN5-related, putative)</i>	0,0001	1,84	0,0000	2,04	0,0291	1,13	0,0305	1,13
NEUROD2	<i>neuronal differentiation 2</i>	0,0000	1,46	0,0001	1,34	0,0001	1,39	0,0470	1,13
PSMD6	<i>proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6</i>	0,0009	1,37	0,0001	1,54	0,0142	1,16	0,0127	1,16
SPATA31C2	<i>SPATA31 subfamily C, member 2</i>	0,0127	1,36	0,0201	1,32	0,0177	1,23	0,0268	1,21
SPX (C12orf39)	<i>spexin hormone</i>	0,0017	1,30	0,0044	1,25	0,0084	1,20	0,0025	1,25
TNFRSF11B	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b</i>	0,0000	4,28	0,0000	1,77	0,0000	1,65	0,0334	1,16
TRABD2B	<i>TraB domain containing 2B</i>	0,0001	1,33	0,0038	1,19	0,0374	1,14	0,0083	1,20
TRIM48	<i>tripartite motif containing 48</i>	0,0104	1,42	0,0307	1,32	0,0057	1,41	0,0334	1,28
TUSC3	<i>tumor suppressor candidate 3</i>	0,0001	1,57	0,0014	1,34	0,0089	1,27	0,0119	1,25
VSTM2L	<i>V-set and transmembrane domain containing 2 like</i>	0,0008	1,46	0,0041	1,34	0,0036	1,25	0,0230	1,17
ZNF267	<i>zinc finger protein 267</i>	0,0477	1,49	0,0255	1,59	0,0355	1,23	0,0205	1,27
ZSCAN32	<i>zinc finger and SCAN domain containing 32</i>	0,0250	1,21	0,0025	1,35	0,0102	1,22	0,0257	1,18

Tabla R3.4: Genes humanos que disminuyeron su expresión en presencia de SseK1. Se muestran el valor de P y el cambio lineal de la expresión (R).

Gen	Descripción	Control/A4		Control/B4		No infectadas/ Silvestre		sseK1/ Silvestre	
		P	R	P	R	P	R	P	R
AHCYL2	<i>adenosylhomocysteinase-like 2</i>	0,0000	1,58	0,0000	1,61	0,0014	1,31	0,0071	1,23
ARHGAP23	<i>Rho GTPase activating protein 23</i>	0,0022	1,64	0,0033	1,58	0,0165	1,45	0,0062	1,56
CSAD	<i>cysteine sulfinic acid decarboxylase</i>	0,0002	1,40	0,0054	1,22	0,0012	1,27	0,0464	1,13
LOC100133315	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2-like</i>	0,0003	1,31	0,0022	1,22	0,0003	1,55	0,0072	1,31
LSM14B	<i>LSM14B, SCD6 homolog B (S. cerevisiae)</i>	0,0000	5,04	0,0000	4,76	0,0042	1,26	0,0266	1,18
PAIP2	<i>poly(A) binding protein interacting protein 2</i>	0,0000	1,73	0,0000	1,59	0,0147	1,16	0,0096	1,18
PCMTD1	<i>protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1</i>	0,0032	1,44	0,0002	1,79	0,0091	1,19	0,0250	1,15
PDE6D	<i>phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta</i>	0,0048	1,28	0,0014	1,36	0,0141	1,24	0,0260	1,21
POLR2D	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D</i>	0,0000	1,70	0,0000	1,62	0,0114	1,24	0,0391	1,18
RALGAPA1	<i>Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1 (catalytic)</i>	0,0061	1,39	0,0389	1,25	0,0002	1,48	0,0403	1,19
RASSF8	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 8</i>	0,0029	1,21	0,0032	1,21	0,0037	1,25	0,0350	1,15
STYXL1	<i>serine/threonine/tyrosine interacting-like 1</i>	0,0000	1,67	0,0091	1,17	0,0047	1,20	0,0390	1,13
ZBTB40	<i>zinc finger and BTB domain containing 40</i>	0,0006	1,25	0,0318	1,11	0,0014	1,23	0,0233	1,13
ZNF552	<i>zinc finger protein 552</i>	0,0029	1,50	0,0089	1,39	0,0012	1,40	0,0278	1,22

Análisis de ontología génica y de interacciones para los genes identificados en el estudio transcriptómico

En la **Tabla R3.5** se muestra el resultado de un análisis de ontología génica, realizado con la base de datos Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) y con las herramientas de AmiGO 2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo/>) (Carbon *et al.*, 2009) que muestra los términos asociados a los genes que incrementaron su expresión en presencia de SseK1 en las categorías función molecular, proceso biológico y componente celular.

Tabla R3.5: Análisis de ontología génica de los genes sobreexpresados en presencia de SseK1

Gen	Función molecular	Proceso biológico	Componente celular
CLEC14A	-Unión a carbohidratos	-----	-Exosoma extracelular (Prunotto <i>et al.</i> , 2013) -Componente integral de membrana
DCUN1D5	-Proteína de unión al complejo ubiquitina ligasa	-Regulación positiva de la actividad transferasa ubiquitina-proteína	-Complejo ubiquitina ligasa -Componente integral de

	-Proteína de unión (Rolland et al., 2014)	-Nedilación de proteínas	membrana
IER2	-Unión al ADN (Takaya et al., 2009)	-Movilidad celular (Neeb et al., 2012) -Diferenciación neuronal -Respuesta al factor de crecimiento de fibroblastos	-Citoplasma (Neeb et al., 2012) -Nucleoplasma -Núcleo (Neeb et al., 2012)
MMP12	-Unión de iones de Ca^{+2} -Unión de iones de Zn^{+2} -Actividad endopeptidasa (Shapiro et al., 1993) -Actividad metaloendopeptidasa (Shapiro et al., 1993)	-Catabolismo del colágeno -Desensamblaje de la matriz extracelular -Organización de la matriz extracelular -Regulación positiva de células epiteliales que intervienen en la cicatrización de heridas (Lyu & Joo, 2005) -Proteolisis -Respuesta a drogas -Respuesta a compuestos orgánicos cíclicos -Cicatrización de heridas, propagación de las células epidérmicas (Lyu & Joo, 2005)	-Matriz extracelular proteica
NAT9	-Proteína de unión -Actividad N acetil transferasa	-Acetilación de los extremos N terminales de proteínas	-Complejo proteico
NEUROD2	-Unión E-box (CANNTG) -Unión a la región reguladora de ADN de secuencia específica de ARN polimerasa II -Actividad de heterodimerización -Correpresor transcripcional -Factor de transcripción, unión a ADN específica de secuencia (McCormick et al., 1996) -Activador transcripcional	-Aprendizaje asociativo -Respuesta de miedo conductual -Respuesta celular a iones de calcio -Respuesta celular al estímulo eléctrico -Desarrollo corteza del cerebelo -Regulación de la transcripción -Regulación de la maduración de la sinapsis -Desarrollo del sistema nervioso (McCormick et al., 1996) -Desarrollo de las neuronas -Regulación positiva de la señalización mediada por calcio -Regulación positiva de la diferenciación de las neuronas -Regulación positiva de la actividad del factor de transcripción de unión a ADN específica de secuencia -Regulación positiva de la plasticidad sináptica -Regulación positiva de la transcripción de promotores transcritos por ARN polimerasa II (McCormick et al., 1996) -Ubiquitinación de proteínas	-Núcleo
PSMD6	-Actividad ATPasa (Ren et al., 2000) -Proteína de unión	-Respuesta al daño del ADN -Vía de señalización del receptor de Fc-epsilon -Transición G1 / S del ciclo celular mitótico -Cascada de MAPK -Señalización de NIK/NF-kappaB -Transducción de señales de proteínas Ras -Vías de señalización del receptor de células T -Activación de la actividad MAPK -Promoción de la anafase dependiente del catabolismo de proteínas dependiente del complejo ubiquitina-proteasoma -Procesamiento de antígenos y presentación de péptido antígeno exógeno a través de MHC de clase I -Proceso de apoptosis -Guía de axones -Metabolismo celular del nitrógeno -Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico	-Citosol -Exosoma extracelular -Nucleoplasma -Complejo accesorio del proteasoma -Complejo proteasoma -Partícula reguladora del proteasoma

		<ul style="list-style-type: none"> -Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos -Expresión génica -Respuesta inmune innata -Vía de señalización del receptor de insulina -Ciclo celular mitótico -Regulación negativa del proceso de apoptosis -Regulación negativa de la vía canónica de señalización Wnt -Regulación negativa de la actividad ubiquitina ligasa de proteína implicada en el ciclo celular mitótico -Vía de señalización del receptor de neurotrofina TRK 	
SPATA31C2	-----	<ul style="list-style-type: none"> -Diferenciación celular -Espermatogénesis 	-Componente integral de membrana
SPX	<ul style="list-style-type: none"> -Neuropéptido con actividad hormonal (Kim <i>et al.</i>, 2014) -Unión a receptor de galanina tipo 2 (Kim <i>et al.</i>, 2014) -Unión a receptor de galanina tipo 3 (Kim <i>et al.</i>, 2014) 	<ul style="list-style-type: none"> -Importación de ácidos grasos de cadena larga -Regulación negativa del apetito -Regulación negativa de la excreción renal del sodio -Regulación positiva de la presión arterial sistémica -Regulación positiva desde promotores de ARNpol II (Kim <i>et al.</i>, 2014) -Regulación de la percepción sensorial del dolor 	<ul style="list-style-type: none"> -Espacio extracelular (Walewski <i>et al.</i>, 2014; Wan <i>et al.</i>, 2010) -Vesículas de transporte
TNFRSF11B	<ul style="list-style-type: none"> -Actividad de citoquina (Tsuda <i>et al.</i>, 1997) -Actividad de receptor (Simonet <i>et al.</i>, 1997) -Activación del factor de necrosis tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> -Vía de señalización de apoptosis -Organización matriz extracelular -Respuesta inmune -Respuesta inflamatoria -Regulación negativa de la resorción ósea -Regulación negativa de odontogénesis -Regulación positiva de la cascada MAPK -Regulación del proceso de apoptosis -Regulación de la proliferación celular -Respuesta a la sustancia que contiene arsénico -Respuesta a drogas -Respuesta al estrógeno -Respuesta a lipopolisacárido -Respuesta a iones Mg^{2+} -Respuesta a nutrientes -Transducción de señales (Tsuda <i>et al.</i>, 1997) -Desarrollo del sistema esquelético (Simonet <i>et al.</i>, 1997) -Vía de señalización mediada por el factor de necrosis tumoral 	<ul style="list-style-type: none"> -Componente integral de la membrana plasmática -Matriz extracelular proteica (Simonet <i>et al.</i>, 1997; Xu <i>et al.</i>, 2004)
TRABD2B	<ul style="list-style-type: none"> -Unión a proteína Wnt (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Unión de iones metálicos -Actividad metaloendopeptidasa (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Unión a proteína 	<ul style="list-style-type: none"> -Regulación negativa de la vía de señalización Wnt (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Regulación positiva de la oligomerización de proteínas (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Regulación positiva de la oxidación de proteínas (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Proteolisis (Zhang <i>et al.</i>, 2012) 	<ul style="list-style-type: none"> -Exosoma extracelular -Componente integral de membrana de orgánulos (Zhang <i>et al.</i>, 2012) -Componente integral de la membrana plasmática (Zhang <i>et al.</i>, 2012)
TRIM48	-Unión de iones de Zn^{2+}	-----	-Intracelular
TUSC3	<ul style="list-style-type: none"> -Contribuye a la actividad asparagina N-glicosiltransferasa -Actividad transportadora de iones de Mg^{2+} a través de la membrana (Zhou & Clapham, 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> -Homeostasis redox celular -Proceso metabólico -Cognición (Molinari <i>et al.</i>, 2008) -Transporte transmembrana de iones de magnesio (Zhou & Clapham, 2009) -Modificación post-traducciona de proteínas -Glicosilación ligada a N de proteínas (Zhou & 	<ul style="list-style-type: none"> -Membrana del retículo endoplásmico -Componente integral de la membrana plasmática (Zhou & Clapham, 2009) -Mitocondrias -Complejo oligosacariltransferasa

		Clapham, 2009)	
VSTM2L	-Unión a proteína	-Regulación negativa del proceso apoptótico neuronal	-Citoplasma -Región extracelular
ZNF267	-Unión a ADN -Unión de iones metálicos -Factor de transcripción	-Regulación de la transcripción -Desarrollo de organismos muticelulares	-Núcleo
ZSCAN32	-Unión a ADN -Actividad de factor de transcripción para ARN polimerasa II -Unión a ion metálico -Unión a proteína	-Regulación de la transcripción desde promotores dependientes de ARN polimerasa II -Transcripción	-Núcleo

Se llevó a cabo también sobre estos genes un análisis de interacciones con la herramienta GeneMANIA (Mostafavi *et al.*, 2008; Zuberi *et al.*, 2013), que realiza una búsqueda en las bases de datos disponibles para detectar interacciones proteína-proteína, proteína-ADN e interacciones genéticas, vías de señalización, datos de expresión génica, dominios proteicos y perfiles fenotípicos. En este caso tan sólo se detectaron conexiones de coexpresión entre algunos de los genes analizados. El resultado del análisis se representa en la **Figura R3.4**.

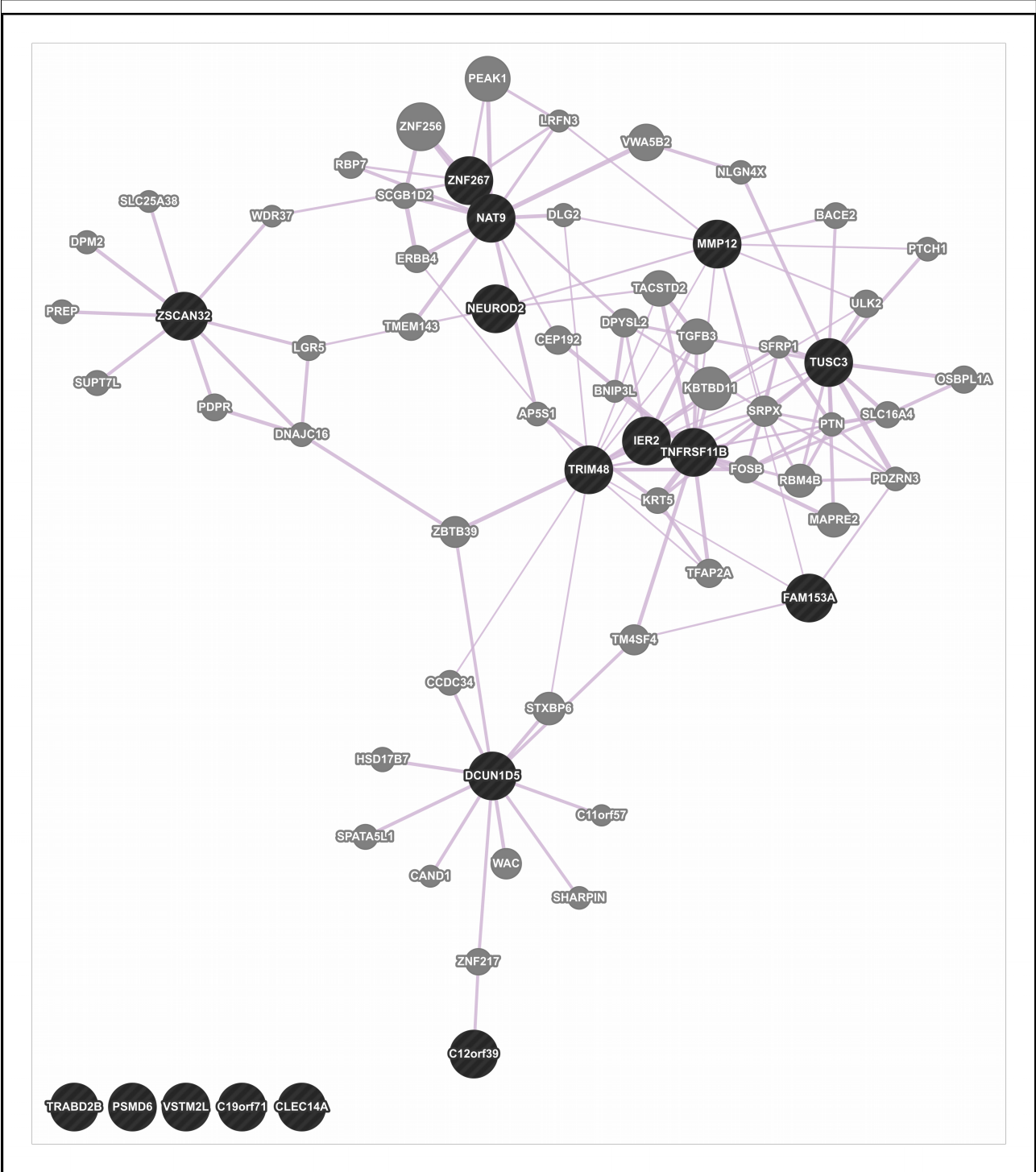


Figura R3 4: Resultados obtenidos con el programa GeneMANIA de análisis de interacciones génicas para los genes con expresión aumentada en presencia de SseK1. Se muestra la red de interacciones entre los genes activados por SseK1 (círculos negros) y los genes necesarios para cerrar dicha red (círculos grises). Las líneas moradas que unen los genes indican coexpresión.

Para los genes de expresión disminuida en presencia de SseK1 se identificaron también los términos de ontología génica asociados (**Tabla R3.6**) y se llevó a cabo un análisis de interacciones

con GeneMANIA (**Figura R3.5**). Entre estos genes se detectó un mayor número de tipos de interacciones (coexpresión, colocalización e interacciones genéticas).

Tabla R3.6: Análisis de ontología génica de los genes cuya expresión disminuye en presencia de SseK1

Gen	Función molecular	Proceso biológico	Componente celular
AHCYL2	-Actividad adenosil-homocisteinasa -Actividad hidrolasa	-Proceso metabólico de un carbono -Ciclo S-adenosilmetionina	-Citosol -Reticulo endoplásmico -Citoplasma -Proyección neuronal
ARHGAP23	-Actividad activadora de GTPasa	-Regulación positiva de actividad GTPasa -Transducción de señal mediada por GTPasa pequeña	-Citosol -Exosoma extracelular (Gonzalez-Begne <i>et al.</i> , 2009)
CSAD	-Unión a piridoxal fosfato -Actividad sulfino-alanina descarboxilasa	-Metabolismo celular de compuestos nitrogenados -Metabolismo de pequeñas moléculas -Catabolismo de aminoácidos con azufre -Biosíntesis de taurina	
LOC100133315	-Unión a ADN dañado	-Reparación de roturas de cadena simple de ADN	-Núcleo
LSM14B	-Unión a ARN poliadenilado (Baltz <i>et al.</i> , 2012)	-Desarrollo de organismos multicelulares -Regulación de la traducción	-Complejo ribonucleoproteico intracelular
PAIP2	-Unión a ARNm -Proteína de unión (Khaleghpour <i>et al.</i> , 2001; Kozlov <i>et al.</i> , 2004; Yoshida <i>et al.</i> , 2006) -Actividad represora de la traducción (Khaleghpour <i>et al.</i> , 2001)	-Memoria -Regulación negativa del inicio de la traducción (Khaleghpour <i>et al.</i> , 2001) -Regulación de la potenciación sináptica a largo plazo -Espermatogénesis	-Citoplasma (Khaleghpour <i>et al.</i> , 2001)
PCMTD1	-Actividad L-isoaspartato (D-aspartato) metiltransferasa	-Metilación de proteínas	-Citosol -Membrana
PDE6D	-Actividad fosfodiesterasa de nucleótido 3', 5'-cíclico -Actividad inhibidora de GTPasa -Unión a GTPasaRab (Marzesco <i>et al.</i> , 1998) -Unión a proteína	-Metabolismo -Regulación negativa de la actividad GTPasa -Organización de orgánulos -Respuesta a estímulo -Percepción visual	-Citosol (Marzesco <i>et al.</i> , 1998) -Citoesqueleto -Membrana de vesículas citoplasmáticas (Marzesco <i>et al.</i> , 1998) -Cilio primario
POLR2D	-Actividad ARN polimerasa (Khazak <i>et al.</i> , 1998) -Unión a nucleótidos -Unión a ADN de cadena simple -Unión a ARN de cadena simple -Unión al factor de iniciación de la traducción	-Adición de 7-metilguanosina al ARNm -Reparación del ADN -Expresión génica -Silenciamiento génico por ARN -Exportación del ARNm desde el núcleo por estrés -Maduración del ARNm -Catabolismo de ARNm transcritos nucleares, vía decaimiento de la reparación por escisión de nucleótidos dependiente de desadenilación -Reparación por escisión de nucleótido -Metabolismo de Piwi-ARNs -Regulación positiva del inicio de la traducción -Regulación positiva de la transcripción vírica -Mantenimiento de la población de células madre somáticas	-Núcleo del complejo ARN pol II unido a ADN (Kershner <i>et al.</i> , 1998; Khazak <i>et al.</i> , 1998) -Órganos de procesamiento de ARNm citoplasmático -Nucleoplasma -Núcleo (Kershner <i>et al.</i> , 1998)

		<ul style="list-style-type: none"> -Transcripción de promotores de ARN pol II (Kershnar et al., 1998; Khazak et al., 1998) -Elongación de la transcripción por la ARN pol II -Iniciación de la transcripción por la ARN pol II -Procesos víricos 	
RALGAPA1	<ul style="list-style-type: none"> -Activador de la actividad GTPasa -Actividad de heterodimerización de proteínas (Shirakawa et al., 2009) 	<ul style="list-style-type: none"> -Activación de la actividad GTPasa -Regulación de transducción de señales mediada por GTPasas pequeñas -Regulación de la transcripción 	<ul style="list-style-type: none"> -Citoplasma -Núcleo
RASSF8		-Transducción de señales	
STYXL1	<ul style="list-style-type: none"> -Actividad tirosina/serina/ treonina fosfatasa 	<ul style="list-style-type: none"> -Transducción de señales intracelulares (Wishart & Dixon, 1998) -Desfosforilación de proteínas 	-Intracelular
ZBTB40	<ul style="list-style-type: none"> -Unión a ADN -Unión a iones metálicos 	<ul style="list-style-type: none"> -Mineralización del hueso (Liu et al., 2010a) -Respuesta a daños en el ADN -Regulación de la transcripción 	-Núcleo
ZNF552	<ul style="list-style-type: none"> -Factor de transcripción -Unión a iones metálicos 	-Regulación negativa de la transcripción	-Núcleo

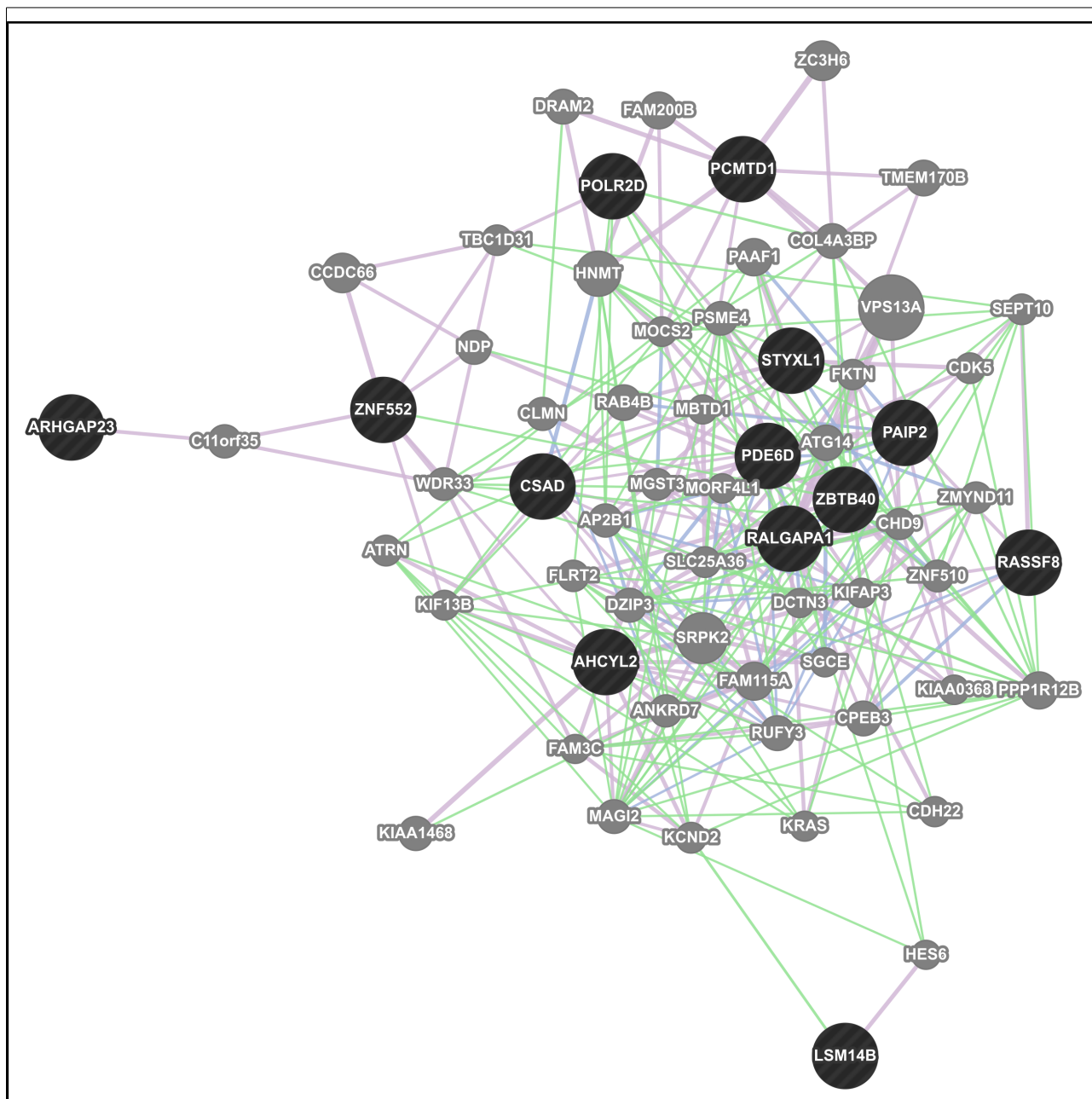


Figura R3.5: Resultados obtenidos con el programa GeneMANIA de análisis de interacciones para los genes con expresión disminuida en presencia de SseK1. Se muestra la red de interacciones entre los genes activados por SseK1 (círculos negros) y los genes necesarios para cerrar dicha red (círculos grises). Las líneas moradas que unen los genes indican coexpresión, las azules colocalización y las verdes interacciones genéticas.

Validación de los datos de las micromatrices mediante qRT-PCR

Para validar los datos obtenidos en el análisis transcriptómico global descrito en los apartados anteriores, seleccionamos cuatro de los 32 genes expresados diferencialmente, dos con expresión aumentada, IER2 y ZNF267, y dos con expresión disminuida, PDE6D y STLYX1. El nivel de ARN correspondiente a estos genes se midió mediante qPCR en las mismas líneas celulares transfectadas

(Figura R3.6A y B) y condiciones de infección (Figura R3.6C y D) empleadas para las micromatrices.

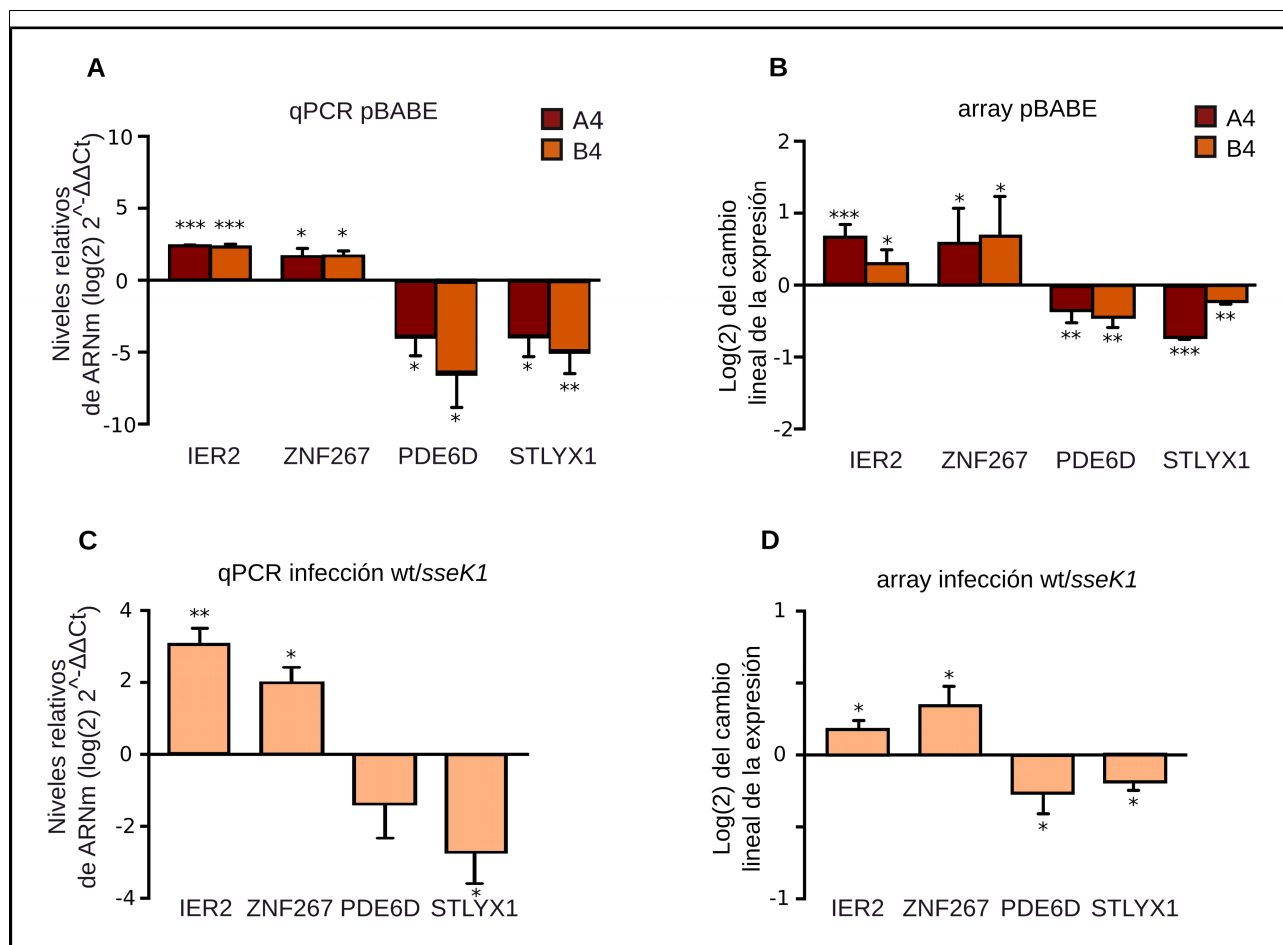


Figura R3.6: Validación de los datos de transcriptómica. (A) Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de dichos genes mediante qPCR para las dos líneas estables A4 y B4 comparados con los de las células control transfectadas con el vector vacío que se toman como valor 1. (B) Representación gráfica de los datos obtenidos en los microarray para los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 en las líneas estables A4 y B4. (C) Cuantificación relativa de los niveles de ARNm de dichos genes mediante qPCR en las infecciones de células HeLa con las estirpes de *Salmonella* silvestre y mutante *sseK1*. (D) Representación gráfica de los datos obtenidos en los microarray para los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 en la comparación de las infecciones de células HeLa con las estirpes de *Salmonella* silvestre y mutante *sseK1*. Se muestran las medias de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación típica. Los ARN se extrajeron de cultivos confluentes para el caso de las células transfectadas, y a 8 h p.i. en las células infectadas. Se muestran con valores positivos el aumento de expresión en presencia de SseK1 y con valores negativos el descenso de expresión en presencia de SseK1. Se muestra mediante asteriscos las diferencias significativas de expresión respecto a la ausencia de SseK1, ($P < 0,05$) *, ($P < 0,01$) ** y ($P < 0,001$) ***.

Cinética de expresión de los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 dependiente de SseK1 durante la infección con *Salmonella*

Para los cuatro genes empleados en la validación de datos de transcriptómica se midió también mediante qPCR el nivel de ARN en distintos momentos tras la infección de células HeLa. En la Figura R3.7 se representa la relación de los niveles de ARN en infecciones con la estirpe silvestre

respecto a infecciones con la estirpe mutante *sseK1*. Para ninguno de los genes probados se observan diferencias significativas entre ambos tipos de infecciones a las 2 h de infección. Para los dos genes clasificados como inducidos en presencia de SseK1, IER2 y ZNF267, los niveles relativos aparecieron aumentados a las 4, 8 y 16 h, con un máximo a las 4 h. Para los dos genes clasificados como reprimidos en presencia de SseK1, PDE6D y STLYX1, el patrón resultó ser más complejo, ya que la reducción relativa de nivel sólo se observó a las 8 h (el tiempo empleado en el análisis global) mientras que se detectó un aumento de nivel relativo a las 4 y las 16 h. Estos resultados son indicativos de la importancia de analizar las consecuencias de la translocación de un efector como SseK1 en distintos momentos de la infección para tratar de entender su función.

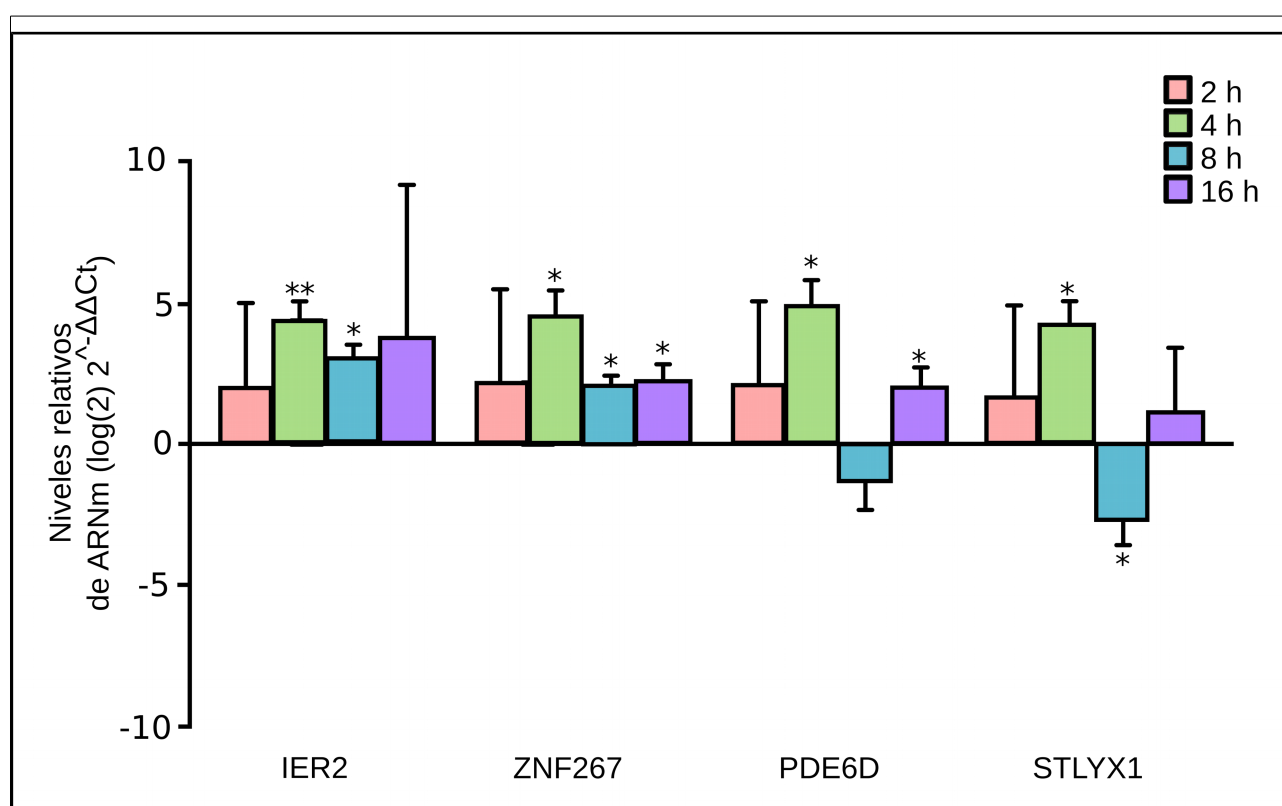


Figura R3.7: Variación de la expresión de los genes IER2, ZNF267, PDE6D y STLYX1 en células HeLa durante una infección con las estirpes de *Salmonella silvestre* y mutante *sseK1*. Se muestran con valores positivos el aumento de expresión en presencia de SseK1 y con valores negativos el descenso de expresión en presencia de SseK1. Se muestra mediante asteriscos las diferencias significativas de expresión respecto a la ausencia de SseK1, ($P < 0,05$) * y ($P < 0,01$) **.

DISCUSIÓN

La realización de escrutinios basados en fusiones CyaA' aleatorias ha demostrado ser eficaz en la detección de efectores de los T3SS de *Salmonella* (Geddes *et al.*, 2005). El escrutinio realizado en el Capítulo 1 de esta tesis detectó efectores ya conocidos pero no detectó genes para nuevos efectores, posiblemente porque se necesite escrutar al menos 10 veces más candidatos para conseguirlo. El resultado más interesante del escrutinio fue la translocación del efector PipB2 en condiciones de inducción del T3SS1: bacterias cultivadas en condiciones invasivas e infección de células epiteliales durante 2 h (**Tabla R1.1**). Este resultado es llamativo ya que previamente PipB2 se había descrito únicamente como un efector del T3SS2.

Los experimentos para detectar la expresión de PipB2 indicaron que éste se sintetiza en cantidad suficiente como para ser translocado en condiciones de inducción del T3SS1 (**Figura R1.3**). Además, la translocación por este sistema a tiempos cortos de infección se confirmó en tres tipos de células hospedadoras, HeLa, RAW264.7 y NRK-49F, usando mutantes de *Salmonella* carentes de la SPI1 o la SPI2 (**Figura R1.1**). Por otro lado, los experimentos de cinética de translocación realizados en células epiteliales HeLa y macrófagos RAW264.7 permiten extraer las siguientes conclusiones:

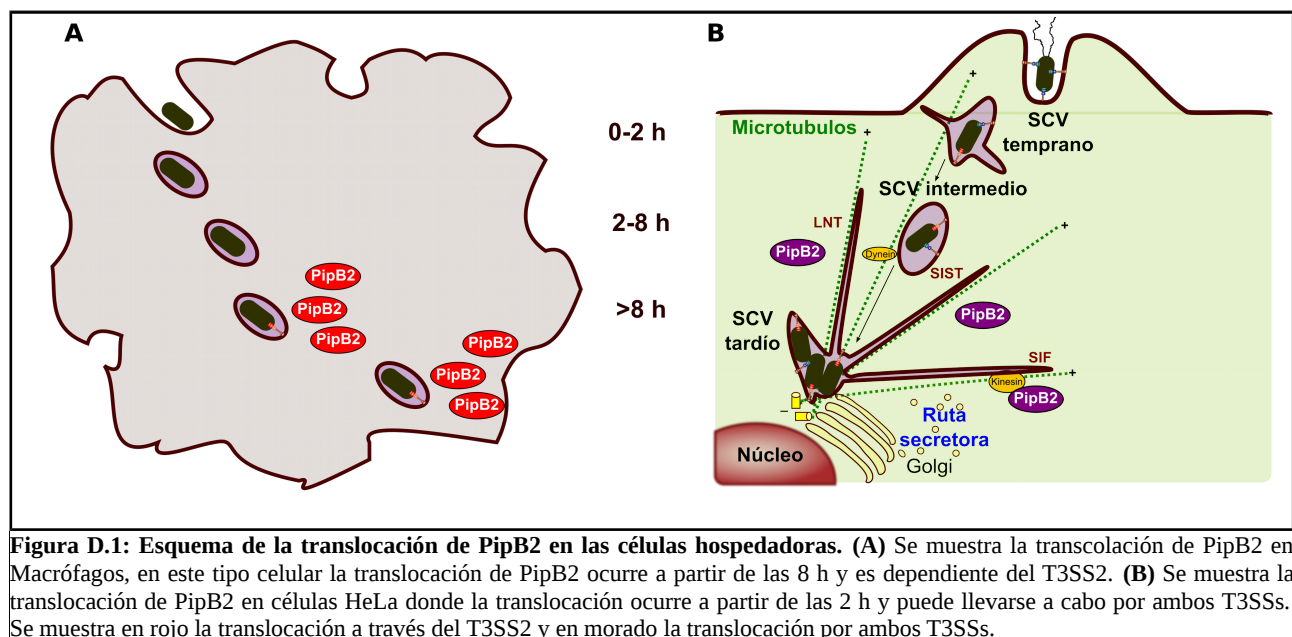
(i) PipB2 puede translocarse por ambos T3SS pero con un patrón diferente dependiendo del tipo celular hospedador.

(ii) En células HeLa la translocación es completamente dependiente del T3SS1 (**Figura R1.2A**). Se ha descrito que en células epiteliales el T3SS1 puede estar activo en etapas tardías de la infección (Hautefort *et al.*, 2008), lo que da sentido a los resultados obtenidos y sugiere una translocación de PipB2 no solo durante la invasión sino también desde el interior de la célula hospedadora. Es probable que las bacterias que secretan PipB2 tras la invasión sean bacterias que han escapado de la vacuola y se están replicando en el citosol ya que se ha mostrado que estas

bacterias, a diferencia de las intravacuolares, son móviles y expresan el T3SS1 (Knodler, 2015; Knodler *et al.*, 2010). Hay que señalar, sin embargo, que la translocación dependiente del T3SS2 en estas células, caso de existir, sería difícil de estudiar puesto que un mutante carente del T3SS1 es incapaz de invadirlas.

(iii) En los macrófagos (**Figura R1.2B**) la translocación fue dependiente del T3SS1 en el momento de la invasión (usando bacterias invasivas) pero dependiente del T3SS2 al estar ya *Salmonella* establecida en su nicho intracelular (usando bacterias no invasivas para evitar la piroptosis). A las 4 hpi no se observó translocación por ninguna vía. Esto sugiere que en este tipo celular las bacterias no invasivas fagocitadas no inducen en ningún momento la expresión del T3SS1 pero expresan el T3SS2 después de las 4 h de infección.

El patrón de translocación de PipB2 en estos tipos celulares es similar al observado para SlrP, otro efector de *S. enterica* serovar Typhimurium que puede secretarse por ambos T3SS (Cordero-Alba & Ramos-Morales, 2014). En la **Figura D.1** se muestra una representación de la translocación de PipB2 en macrófagos (**Figura D.1A**) y en células epiteliales HeLa (**Figura D.1B**).



Diversos estudios con otros efectores muestran la existencia de secuencias señal para la translocación de efectores de los T3SSs en el extremo N-terminal (Crawford & Kaper, 2002; Karavolos *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2001, 2002; Schechter *et al.*, 2004). Un estudio previo demostró la translocación de 225 aminoácidos del extremo N-terminal de PipB2 (Knodler *et al.*, 2003). Los experimentos realizados aquí sugieren que la secuencia mínima necesaria para la translocación de este efector a través de ambos T3SS puede reducirse a sus 10 primeros aminoácidos (**Figura R1.5**). Esto concuerda con lo publicado para otros efectores (Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2011; Kim *et al.*, 2007; Rüssmann *et al.*, 2002).

Extensiones de la técnica descrita por Wanner y Datsenko para interrumpir genes en el cromosoma de *E. coli* (Datsenko & Wanner, 2000), han permitido obtener fusiones *lacZ* o 3xFLAG de manera dirigida en el cromosoma bacteriano (Ellermeier *et al.*, 2002; Uzzau *et al.*, 2001). Inspirándonos en esta idea se diseñó un protocolo para realizar fusiones CyaA' en localizaciones específicas del cromosoma bacteriano (**Figura R1.6**) con las que realizar estudios sobre los efectores en situaciones mas fisiológicas que las que se obtienen al expresar los efectores desde un plásmido multicopia ya sea bajo un promotor constitutivo o desde el promotor endógeno. Este método se ha empleado por primera vez para el estudio del efector SseK1, que ha sido el objeto de los Capítulos 2 y 3 de esta tesis.

Aunque las funciones de los efectores de la familia SseK son desconocidas, la similitud de sus secuencias de aminoácidos apunta a redundancia funcional. En estudios anteriores se había demostrado que tanto el triple mutante *sseK1 sseK2 sseK3* como el doble mutante *sseK1 sseK2* estaban atenuados para la virulencia en el modelo de ratón. Los resultados del Capítulo 2 de esta tesis indican que SseK1 es importante en sí mismo durante la fase sistémica de la infección en el modelo de ratón, ya que un mutante *sseK1* muestra atenuación significativa tanto en infecciones

orales como intraperitoneales (**Figura R2.1**). Los resultados también sugieren que SseK1 no es necesario para la invasión ni la proliferación intracelular en siete líneas celulares de mamíferos. Esto está en concordancia con los datos previos de otros grupos que no detectaron ningún fenotipo para este mutante en las infecciones de células HeLa, Caco2 o RAW264.7 (Brown *et al.*, 2011; Buckner *et al.*, 2011; Kujat Choy *et al.*, 2004). Sin embargo, hay que señalar que en uno de estos trabajos se encontró una reducción del 60% en el índice de replicación del triple mutante *sseK1 sseK2 sseK3* en el interior de los macrófagos RAW264.7 (Buckner *et al.*, 2011). Las discrepancias entre los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, señaladas con más detalle en la Introducción, pueden ser una consecuencia de las diferencias en detalles experimentales como las cepas concretas de *Salmonella* y las *moi* utilizadas.

SseK1 se describió inicialmente como un efector del T3SS2 en células HeLa (Brown *et al.*, 2011; Kujat Choy *et al.*, 2004). En esta tesis se ha llevado a cabo un análisis detallado de la translocación de este efector utilizando tres líneas de células hospedadoras, procedentes de tres especies de mamíferos diferentes, y dos fusiones CyaA' diferentes (**Figura R2.3**). Los resultados sugieren varias conclusiones y comentarios:

(i) Una primera conclusión general es que SseK1 puede secretarse a través de ambos T3SS, aunque con diferentes cinéticas dependiendo del tipo de célula hospedadora. Por tanto, el uso de una muestra amplia de tipos de células hospedadoras es esencial para entender completamente la función de los efectores de los T3SS.

(ii) La translocación a tiempos p.i. cortos (1-2 h) es dependiente del T3SS1 pero sólo observable cuando la fusión SseK1-CyaA' se expresa a partir de un promotor constitutivo en un plásmido. Este resultado sugiere que en condiciones fisiológicas (expresión de su propio promotor en el cromosoma) SseK1 no se sintetiza a un nivel suficiente para permitir la translocación

detectable antes de la invasión de la célula hospedadora. También indica que el uso de fusiones cromosómicas es más fiable que el de las plasmídicas si se quieren obtener conclusiones acerca de las condiciones necesarias para la translocación de los efectores de los T3SS. Se observa aquí una diferencia con PipB2 ya que la translocación de éste sí fue detectable durante la invasión (**Figura R1.2**).

(iii) La translocación en células HeLa es dependiente del T3SS1, ya que no se detectó en un mutante carente de este sistema (**Figura R2.3B**). Como se ha mencionado antes para el caso de PipB2, este resultado puede explicarse en parte por el hecho de que el mecanismo de entrada mediado por T3SS1 es esencial para la invasión de estas células. Como consecuencia de ello, la translocación desde bacterias internalizadas a través del T3SS2, si existiera, no se podría detectar en el mutante Δ SPI1.

(iv) La translocación en fibroblastos NRK, aunque es dependiente del T3SS1 a 4 h p.i., parece ocurrir a través de ambos sistemas a 8 y 16 h p.i., ya que se requiere la inactivación simultánea de ambos T3SS para impedir el aumento de AMPc (**Figura R2.3F**). A diferencia de lo que ocurre en células HeLa, en este modelo sí es posible detectar la translocación dependiente del T3SS2 usando el mutante Δ SPI1 ya que *Salmonella* puede invadir fibroblastos por medio de diversos mecanismos, algunos de ellos independientes del T3SS1 ([Aiastui et al., 2010](#)).

(v) La translocación de SseK1 en macrófagos infectados con bacterias no invasivas fue dependiente del T3SS2 y se detectó a 8 y 16 h p.i., pero no a 4 h p.i. (**Figura R2.4D**). Esto es similar a la translocación de SseK1 dependiente del T3SS2 observada en fibroblastos infectados con bacterias invasoras y sugiere que este sistema comienza a ser funcional entre 4 y 8 h después de la internalización en ambos tipos de células. Los resultados en células RAW confirman las

conclusiones obtenidas con PipB2 en el sentido de que las bacterias no invasivas fagocitadas son incapaces de inducir T3SS1 dentro de estas células.

Como se ha comentado antes en relación con PipB2, estos resultados son coherentes con la expresión simultánea del T3SS1 y del T3SS2 en el interior de las células HeLa (Hautefort *et al.*, 2008), posiblemente debida a la existencia de dos subpoblaciones de *Salmonella* en las células epiteliales: una subpoblación intravacuolar que expresa el T3SS2 y una subpoblación citosólica que expresa el T3SS1 (Knodler *et al.*, 2010). *Salmonella* se puede detectar también en el citosol de fibroblastos y macrófagos, aunque la permisividad para la supervivencia y replicación de *Salmonella* en el citosol depende del tipo celular (revisado en (Knodler, 2015)). En la **Figura D.2** se muestra un esquema de la translocación de SseK1 en los diferentes tipos celulares estudiados en esta tesis.

En esta tesis, también se utiliza una combinación de fusiones *lac*, 3xFLAG y *lux* para analizar las condiciones ambientales y los factores genéticos implicados en la regulación de la expresión de *sseK1*. La expresión máxima en medio rico se obtuvo con una concentración 0,3 M de NaCl y se observó una pequeña represión con concentraciones de NaCl inferiores y superiores (**Figura R2.3B**). Dos factores adicionales que disminuyeron la expresión de *sseK1* en medio rico fueron el pH ácido y la presencia de ácido butírico (**Figura R2.3C**), un ácido graso de cadena corta importante producido en el intestino por la fermentación anaerobia bacteriana. Se sabe que este ácido orgánico reprime la SPI1 y otros genes relacionados con el T3SS1 (Cardenal-Muñoz & Ramos-Morales, 2011; Gantois *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2009; Lawhon *et al.*, 2002). La expresión en un medio mínimo que imita las condiciones intravacuolares (LPM) fue mayor que en medio rico (**Figura R2.2A**). Sin embargo, el pH ácido, que es una de las señales ambientales utilizadas para inducir la SPI2, tuvo un impacto negativo sobre la expresión de *sseK1* también en medio mínimo

(Figura R2.2D). Estos datos, junto con los de translocación que se muestran en la Figura R2.3, sugieren que la expresión de *sseK1* podría reprimirse parcialmente durante el paso a través del estómago y el intestino, pero se induciría después de la invasión de las células hospedadoras y especialmente después de la liberación en el citosol de las células no fagocíticas.

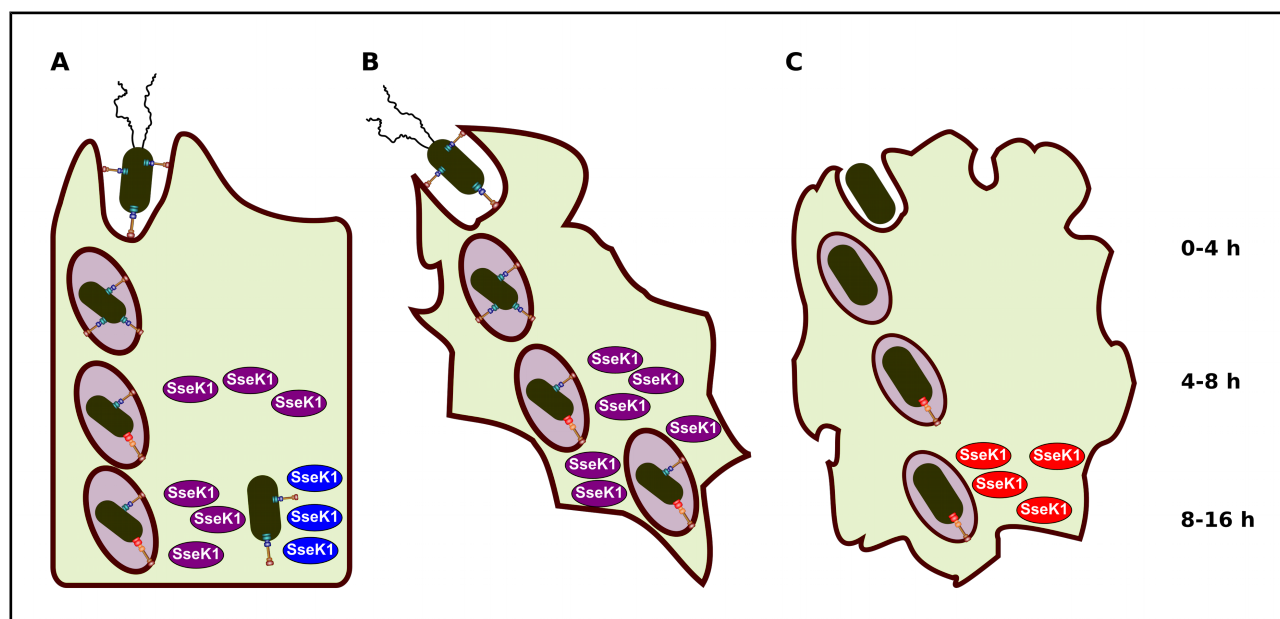


Figura D.2: Esquema de la translocación de SseK1 en las células hospedadoras. (A) Se muestra la translocación de SseK1 en células epiteliales HeLa, en este tipo celular la translocación ocurre a partir de las 4 horas y puede ocurrir a través de ambos T3SSs. Esto ocurre también en fibroblastos (B) mientras que en macrófagos (C) la translocación ocurre a partir de las 8 h y totalmente dependiente del T3SS2. Se muestra en azul la translocación a través del T3SS1, en rojo la translocación a través del T3SS2 y en morado la translocación a través de ambos T3SSs.

Entre los reguladores de la SPI1 y de la SPI2 que hemos ensayado, sólo el sistema regulador de dos componentes PhoQ/PhoP tuvo un efecto significativo sobre la expresión de *sseK1* (Figura R2.4 y Figura R2.6). PhoQ es la proteína de membrana que activa PhoP en respuesta a la baja concentración de Mg^{2+} (Montagne *et al.*, 2001; Vécovi *et al.*, 1996). PhoP es un factor de transcripción que regula la expresión de alrededor del 3% de los genes de *Salmonella* (Miller & Mekalanos, 1990), algunos de ellos implicados en virulencia. La regulación positiva de *sseK1* por este sistema es coherente con el efecto de las concentraciones de Mg^{2+} en su expresión (Figura R2.2D).

Los resultados obtenidos a nivel de proteínas con una fusión SseK1-3xFLAG, en los que se muestra que esta proteína es indetectable en fondo *phoP* nulo, son coherentes con los publicados previamente usando una fusión 2xHA (Kujat Choy *et al.*, 2004). Nuestros resultados también mostraron que este efecto drástico se observa específicamente en condiciones de inducción de la SPI2 (**Figura R2.4**), lo que sugiere que, en condiciones de inducción de la SPI1 hay otros factores no identificados que permiten la síntesis de SseK1 en ausencia de PhoP. La comparación entre los resultados obtenidos a nivel de proteínas (Western blot en la **Figura R2.4**) y los resultados obtenidos utilizando una fusión traduccional cromosómica *sseK1::lacZ* (actividades β -galactosidasa en la **Figura R2.4B**) también sugiere un efecto indirecto postraduccional además del efecto transcripcional que se espera para un regulador como PhoP.

Mientras que el sistema PhoQ/PhoP se considera un sistema de regulación ancestral conservado en las bacterias entéricas que detecta concentraciones de Mg^{2+} , el sistema de dos componentes SsrA/SsrB es específico de *Salmonella* y es activado por pH ácido (Miao *et al.*, 2002; Mulder *et al.*, 2015). SsrB es necesario para la expresión del T3SS2 y de algunos de sus efectores codificados fuera de la SPI2 (Cirillo *et al.*, 1998b; Ochman *et al.*, 1996; Worley *et al.*, 2000). Debido a que PhoP controla la expresión del regulador SsrB a nivel de la transcripción y del sensor SsrA a nivel postranscripcional (Bijlsma & Groisman, 2005), también regula indirectamente la expresión de genes controlados por SsrB. Sin embargo, el análisis de epistasia que llevamos a cabo combinando una mutación nula *ssrB* con una mutación activadora *phoQ24* (**Figura R2.4**) mostró claramente que el efecto de PhoP en *sseK1* es independiente de SsrB. Esto es coherente con la inducción de la expresión de *sseK1* por baja concentración de Mg^{2+} , pero no por la bajada de pH. Este resultado también sugería la posibilidad de que PhoP regulara directamente a *sseK1*. Se han aportado dos tipos de pruebas para apoyar esta hipótesis:

(i) Ciertas mutaciones puntuales que alteran el posible sitio de unión a PhoP detectado en el promotor de *sseK1* eliminan la regulación por PhoP de una fusión P_{sseK1} -*lux* (**Figuras R2.5 y R2.6**).

(ii) La unión directa de PhoP a la región promotora de *sseK1* se confirmó por un análisis EMSA (**Figura R2.7A**). Además, la unión se redujo significativamente al mutar el presunto sitio de unión a PhoP (**Figura R2.7B**).

En la **Figura D.3** se esquematiza la regulación de la expresión de *sseK1* a través del sistema PhoQ/ PhoP en situación de baja concentración de Mg^{2+} .

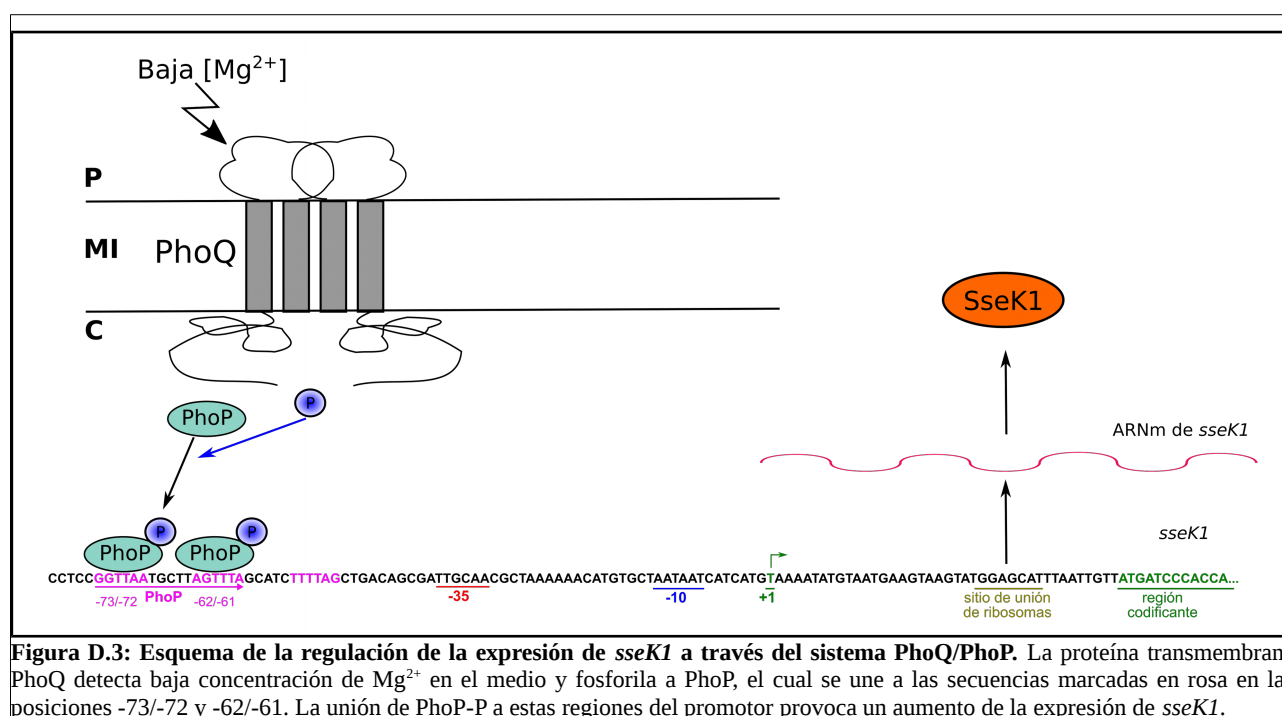


Figura D.3: Esquema de la regulación de la expresión de *sseK1* a través del sistema PhoQ/PhoP. La proteína transmembrana PhoQ detecta baja concentración de Mg^{2+} en el medio y fosforila a PhoP, el cual se une a las secuencias marcadas en rosa en las posiciones -73/-72 y -62/-61. La unión de PhoP-P a estas regiones del promotor provoca un aumento de la expresión de *sseK1*.

La fusión bioluminiscente que se usa en esta tesis mostró una gran sensibilidad y se utilizó para demostrar *in vivo* la inducción, dependiente de PhoP, de *sseK1* en el interior de macrófagos RAW264.7 (**Figura R2.8**), lo que da un mayor apoyo a las conclusiones obtenidas utilizando un medio de cultivo (LPM) que imita las condiciones intravacuolares (**Figuras R2.4**). Esta fusión también podría ser, en principio, útil para futuros experimentos relacionados con el estudio de la expresión de *sseK1* en modelos animales.

Tras el estudio de la expresión y translocación de SseK1 realizado en el **Capítulo 2**, en el último capítulo iniciamos el estudio de los efectos de SseK1 en la célula hospedadora. Para ello empleamos dos estrategias: la búsqueda de proteínas del hospedador que puedan ser dianas de la interacción con SseK1 y el análisis transcriptómico de la célula hospedadora en presencia y ausencia de SseK1.

Para el mejor entendimiento del papel de los efectores en la virulencia es esencial conocer las interacciones de los efectores con proteínas del hospedador. La técnica del doble híbrido en levaduras es muy eficaz para la detección de interacciones y ha sido empleada previamente en nuestro laboratorio para identificar la interacción del efector SlrP con las proteínas tiorredoxina (Trx) y ERdj3 ([Bernal-Bayard & Ramos-Morales, 2009](#); [Bernal-Bayard *et al.*, 2010](#)). Los resultados obtenidos aquí muestran 7 proteínas del hospedador que podrían interactuar con SseK1: TBCB, ZBTB16, H3F3A, H3F3B, CENPA, HIRIP3 y XRCC6 (**Tabla R3.1** y **Figura R3.2**). Se observan también diferencias en la expresión de los genes indicadores que parecen indicar que las interacciones serían más estables en el caso de TBCB y ZNF16 (**Figura R3.2**). Además estos dos candidatos aparecieron con una mayor frecuencia, 116 veces la proteína TBCB y 7 la proteína ZBTB16. Todo esto sugiere que se trata de los dos candidatos a los que habrá que prestar mayor atención en experimentos futuros, sin descartar que los demás puedan resultar también interesantes.

En cualquier caso, el primer paso para la continuación de este trabajo será la confirmación de las interacciones por métodos independientes, como pueden ser la cromatografía de afinidad y la coimmunoprecipitación. A continuación se dan algunos datos sobre cada candidato y sugerencias sobre posibles aspectos relacionados que podrían abordarse en el futuro.

TBCB (*tubulin-folding cofactor B*) se describió en 1997 como un nuevo cofactor capaz de potenciar la eficiencia del plegamiento de la α -tubulina in vitro ([Tian *et al.*, 1997](#)). Este cofactor coopera con TBCE en el plegamiento de α -tubulina y en la disociación de heterodímeros de

tubulina (Carranza *et al.*, 2013; Serna *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 1997). Sería interesante estudiar si la sobreexpresión de SseK1 en células de mamífero tiene algún efecto en la estabilidad de la red de microtúbulos, como se ha visto, por ejemplo, con el efector EseG de *Edwardsiella tarda* (Xie *et al.*, 2010). Es interesante señalar también que hay diversos procesos inducidos por la infección con *Salmonella* en los que intervienen microtúbulos. Así, los microtúbulos dan soporte a los distintos tipos de redes tubulares que se extienden desde la SCV y son característicos de las infecciones con *Salmonella*: SIF (*Salmonella-induced filaments*) (Brumell *et al.*, 2002; Garcia-del Portillo *et al.*, 1993), SIST (*Salmonella-induced secretory carrier membrane protein 3 (SCAMP3) tubules*) y LNT (*LAMP1-negative tubules*) (Mota *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2010). Recientemente se ha sugerido también un papel de la estabilidad de los microtúbulos en la susceptibilidad a la piroptosis, un tipo de muerte celular dependiente de caspasa 1 inducida por *Salmonella* en células hospedadoras (Salinas *et al.*, 2014). Será necesario diseñar experimentos para probar la posible implicación de SseK1 en estos procesos y, caso de existir esa implicación, la relevancia de la interacción con TBCB en los mismos. En estudios previos no se han detectado cambios en la formación de la SCV o de los SIF en células epiteliales debidos a la ausencia de SseK1 (Kujat Choy *et al.*, 2004; Rajashekar *et al.*, 2014). En ensayos futuros se podría estudiar el efecto de la expresión transitoria de SseK1 mediante transfección y habría que tener en cuenta la posible redundancia de los efectores de la misma familia.

ZBTB16 (*zinc finger and BTB domain containing 16*), también llamado PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) es un factor de transcripción de 673 aminoácidos que contiene un dominio BTB amino terminal y nueve dominios dedos de zinc típicos de la familia Krüppel en la región carboxilo terminal (Chen *et al.*, 1993). Miembros de esta familia están implicados en varios procesos como la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación y el desarrollo (Pearson *et al.*, 2008). En células linfoides ZBTB16 interacciona, por medio de su dominio BTB, con la ligasa de

ubiquitina E3 CUL3 y la transporta al núcleo para alterar el patrón de ubiquitinación de un complejo de modificación de la cromatina (Mathew *et al.*, 2012). ZBTB16 no sólo se localiza en el núcleo sino también en el citoplasma (Costoya *et al.*, 2008), lo que sugiere una función adicional no nuclear. De hecho, recientemente se ha descrito que el complejo ligasa de ubiquitina ZBTB16-CUL3-ROC1 regula la autofagia al promover la ubiquitinación y degradación del regulador de autofagia ATG14L (Zhang *et al.*, 2015a). La célula hospedadora puede usar la autofagia como un potente mecanismo para eliminar patógenos intracelulares. *Salmonella*, sin embargo, contrarresta este mecanismo activando el regulador negativo de autofagia mTOR (Tattoli *et al.*, 2012) y desubiquitinando proteínas de la SCV con su efector SseL (Mesquita *et al.*, 2012). Todos estos datos invitan a explorar tanto la posibilidad de que SseK1 pudiera alterar la transcripción de genes del hospedador, algo que se aborda en la última parte de la tesis, como la de que pueda participar en la modulación de la autofagia.

Las demás proteínas capaces de interaccionar con SseK1 se asocian de una u otra manera con la cromatina: H3.3 y CENPA son variantes de la histona H3, HIRIP3 interacciona con las histonas H2B y H3, y Ku70 está implicado en la reparación de daños en el ADN y en el mantenimiento de los telómeros. Para darle sentido a estas interacciones sería preciso demostrar una localización parcialmente nuclear de SseK1 (hasta ahora descrita como citosólica).

La segunda estrategia para el estudio de los efectos de SseK1 en la célula hospedadora, el análisis transcriptómico, se emplea en la última parte del Capítulo 3 de esta tesis. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se habían analizado los cambios a nivel transcriptómico ocasionados por la expresión estable del efector SteA en células HeLa (Cardenal-Muñoz *et al.*, 2014). Aquí, para el caso de SseK1, se emplea la misma aproximación pero además se complementa con un estudio de los efectos de la infección de las mismas células con *Salmonella* silvestres y

mutantes *sseK1*. De esta manera ha sido posible identificar 32 genes cuya expresión cambia significativamente en presencia de SseK1, tanto si se introduce aisladamente en células hospedadoras mediante transfección como si se transloca desde la bacteria durante una infección con la estirpe silvestre. En concreto, se encontraron 18 genes que aumentan su expresión y 14 que disminuyen su expresión en presencia de SseK1 (**Tabla R3.3** y **Tabla R3.4**). Un aspecto que habrá que analizar en el futuro será la posible regulación de estos genes por el factor de transcripción ZBTB16, detectado en el escrutinio de doble híbrido con SseK1, si bien ninguno de ellos ha sido descrito hasta el momento como diana directa de este factor ([Liu et al., 2015](#)).

El análisis de ontología génica reveló que estos genes están implicados en una gran variedad de procesos entre los que se encuentran la apoptosis (PSMD6, TNFRSF11B, VSTM2L), la diferenciación celular (IER2, NEUROD2, SPATA31C2), el metabolismo (CSAD, TUCS3), la respuesta inmune (TNFRSF11B), la proteólisis (DCUN1D5, MMP12, TRABD2B), la reparación del ADN (LOC100133315, POLR2D), vías de señalización mediadas por GTPasas (ARHGAP23, PDE6D, RALGAPA1, RASSF8, STYXL1) y la regulación de la transcripción y de la traducción (LSM14B, NEUROD2, PAIP2, SPX, ZBTB40, ZNF267, ZNF552, ZSCAN32) (**Tablas R3.5 y R3.6**). No se detectó, sin embargo, enriquecimiento significativo de ningún término de ontología específico que pudiera guiarnos en los estudios futuros.

El estudio transcriptómico con micromatrices se complementó con un análisis mediante qRT-PCR de cuatro de los genes alterados. Este análisis permitió validar los datos obtenidos tanto para las transfecciones como para las infecciones de células HeLa de 8 h de duración. La misma técnica se empleó para estudiar la cinética de expresión de los genes seleccionados durante las infecciones (**Figura R3.7**). Los resultados indican que no existen diferencias significativas en la expresión de dichos genes a 2 hpi, pero que empiezan a verse diferencias significativas a partir de las 4 hpi. Esto

está en concordancia con los datos obtenidos de la cinética de translocación de SseK1 en células HeLa (**Figura R2.4B**) que se produce a partir de las 4 hpi. En el caso de los dos genes reprimidos por SseK1 analizados llama la atención que, aunque sus niveles desciendan a las 8 h de infección, se vean aumentados en otros momentos (4h, 16 h). Se desconocen las razones de ese comportamiento pero es posible que durante las infecciones, a diferencia de lo que ocurre en las transfecciones, otros efectores estén interfiriendo con el efecto de SseK1. Hay ejemplos previos para otros efectores de diferencias importantes según se realicen ensayos de infección con *Salmonella* o de transfección (Du & Galán, 2009). También existen diferencias producidas por un mismo efector en distinto tiempo de la infección (Liu *et al.*, 2010). Además se conocen casos en los que dos efectores tienen efectos opuestos en la célula hospedadora, como SifA y SseJ, que están implicados en la formación de los Sifs (Beuzón *et al.*, 2000; Birmingham *et al.*, 2005; Ohlson *et al.*, 2005; Ruiz-Albert *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 1996); o como SifA y PipB2, que muestran efectos antagónicos sobre la kinesina-1 (Henry *et al.*, 2006).

En cualquier caso, se requiere un análisis más detallado de cada uno de los genes detectados en este estudio para tratar de establecer su relevancia durante las infecciones con *Salmonella*.

CONCLUSIONES

- (i) El efector PipB2 de *S. enterica* serovar Typhimurium puede translocarse a las células hospedadoras no sólo a través del T3SS2 como estaba descrito sino también a través del T3SS1.
- (ii) SseK1 es un factor de virulencia en el modelo de ratón *Nramp*^{-/-}.
- (iii) El efector SseK1 se transloca a través de uno u otro de los T3SS de *S. enterica* serovar Typhimurium dependiendo del tipo celular hospedador y del momento de la infección.
- (iv) La transcripción de *sseK1* está regulada positivamente y de manera directa por el sistema de dos componentes PhoQ/PhoP.
- (v) El sistema de doble híbrido en levaduras sugiere la interacción de SseK1 con proteínas humanas implicadas en procesos de nucleación de tubulina, regulación de la transcripción, organización de la cromatina y reparación del ADN.
- (vi) La presencia de SseK1 en células humanas da lugar a la expresión diferencial de al menos 32 genes.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiastui, A., Pucciarelli, M. G. & García-del Portillo, F. (2010).** *Salmonella enterica* serovar typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* **78**, 2700–13.
- Akeda, Y. & Galán, J. E. (2005).** Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911–5.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H. & Fallman, M. (2011).** Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1639–44.
- Allshire, R. C. & Karpen, G. H. (2008).** Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet* **9**, 923–37.
- Altier, C., Suyemoto, M. & Lawhon, S. D. (2000).** Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect Immun* **68**, 6790–7.
- Altier, C. (2005).** Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol* **43 Spec No**, 85–92.
- Alvarez-Martinez, C. E. & Christie, P. J. (2009).** Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 775–808.
- Anderson, D. M., Fouts, D. E., Collmer, A. & Schneewind, O. (1999).** Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA targeting signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12839–43.
- Arnold, R., Brandmaier, S., Kleine, F., Tischler, P., Heinz, E., Behrens, S., Niinikoski, A., Mewes, H.-W., Horn, M. & Rattei, T. (2009).** Sequence-based prediction of type III secreted proteins. *PLoS Pathog* **5**, e1000376. Public Library of Science.
- Assrir, N., Filhol, O., Galisson, F. & Lipinski, M. (2007).** HIRIP3 is a nuclear phosphoprotein interacting with and phosphorylated by the serine-threonine kinase CK2. *Biol Chem* **388**, 391–8.
- Aussel, L., Zhao, W., Hébrard, M., Guilhon, A.-A., Viala, J. P. M., Henri, S., Chasson, L., Gorvel, J.-P., Barras, F. & Méresse, S. (2011).** *Salmonella* detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol Microbiol* **80**, 628–640.
- Baek, C.-H., Wang, S., Roland, K. L. & Curtiss, R. (2009).** Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) acts as a virulence repressor in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **191**, 1278–92.
- Bajaj, V., Hwang, C. & Lee, C. A. (1995).** *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol Microbiol* **18**, 715–727.

- Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C. & Lee, C. A. (1996).** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hilA* expression. *Mol Microbiol* **22**, 703–714.
- Bakowski, M. A., Cirulis, J. T., Brown, N. F., Finlay, B. B. & Brumell, J. H. (2007).** SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion. *Cell Microbiol* **9**, 2839–55.
- Bakowski, M. A., Braun, V. & Brumell, J. H. (2008).** *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**, 2022–31.
- Bakshi, C. S., Singh, V. P., Wood, M. W., Jones, P. W., Galyov, E. E., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (2000).** Identification of SopE2, a *Salmonella* secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* **182**, 2341–4.
- Balbontín, R., Rowley, G., Pucciarelli, M. G., López-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., García-Del Portillo, F., Hinton, J. C. D. & Casadesús, J. (2006).** DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **188**, 8160–8.
- Baltz, A. G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K. & other authors. (2012).** The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell* **46**, 674–90. Elsevier.
- Barlag, B. & Hensel, M. (2015).** The giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *Molecules* **20**, 1134–50.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martinez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Russmann, H. & Hardt, W.-D. (2003).** Pretreatment of Mice with Streptomycin Provides a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis Model That Allows Analysis of Both Pathogen and Host. *Infect Immun* **71**, 2839–2858.
- Baumann, P. & West, S. C. (1998).** DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14066–70.
- Bäumler, A. J. (1997).** The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. *Trends Microbiol* **5**, 318–22.
- Bäumler, A. J. & Heffron, F. (1995).** Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**, 2087–97.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Bowe, F. A., Kusters, J. G., Hoffmann, S. & Heffron, F. (1996).** The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. *Infect Immun* **64**, 61–8.
- Bäumler, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A. & Adams, L. G. (1998).** Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **66**, 4579–87.
- Baxter, M. A. & Jones, B. D. (2005).** The *fimYZ* genes regulate *Salmonella enterica*

- Serovar Typhimurium invasion in addition to type 1 fimbrial expression and bacterial motility. *Infect Immun* **73**, 1377–85.
- Baxter, M. A., Fahlen, T. F., Wilson, R. L. & Jones, B. D. (2003).** HilE interacts with HilD and negatively regulates *hila* transcription and expression of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasive phenotype. *Infect Immun* **71**, 1295–305.
- Bellamy, R. (1999).** The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect* **1**, 23–7.
- Berkowitz, D., Hushon, J. M., Whitfield, H. J., Roth, J. & Ames, B. N. (1968).** Procedure for identifying nonsense mutations. *J Bacteriol* **96**, 215–20.
- Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2009).** *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**, 27587–95.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Muñoz, E., Ramos-Morales, F. & Bernal-Bayard, Joaquín; Cardenal-Muñoz, Elena; Ramos-Morales, F. (2010).** The *Salmonella* type III secretion effector, *salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**, 16360–8.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293–300.
- Beuzón, C. R., Méresse, S., Unsworth, K. E., Ruíz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E. & Holden, D. W. (2000).** *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* **19**, 3235–49.
- Beuzón, C. R. & Holden, D. W. (2001).** Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect* **3**, 1345–1352.
- Bianchi, A. & de Lange, T. (1999).** Ku Binds Telomeric DNA in Vitro. *J Biol Chem* **274**, 21223–21227.
- Bijlsma, J. J. E. & Groisman, E. a. (2005).** The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **57**, 85–96.
- Birmingham, C. L., Jiang, X., Ohlson, M. B., Miller, S. I. & Brumell, J. H. (2005).** *Salmonella*-induced filament formation is a dynamic phenotype induced by rapidly replicating *Salmonella enterica* serovar typhimurium in epithelial cells. *Infect Immun* **73**, 1204–8.
- Birnboim, H. C. (1983).** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243–55.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J. & Groisman, E. A. (1999).** The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**, 998–1004.
- Blattner, F. R. (1997).** The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (80-)* **277**, 1453–1462. American Association for the Advancement of Science.
- Blondel, C. J., Jiménez, J. C., Contreras, I. & Santiviago, C. A. (2009).** Comparative

- genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* **10**, 354.
- Boddicker, J. D. & Jones, B. D. (2004).** Lon protease activity causes down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion gene expression after infection of epithelial cells. *Infect Immun* **72**, 2002–13.
- Boonyom, R., Karavolos, M. H., Bulmer, D. M. & Khan, C. M. A. (2010).** *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) type III secretion of SopD involves N- and C-terminal signals and direct binding to the InvC ATPase. *Microbiology* **156**, 1805–14.
- Boucrot, E., Henry, T., Borg, J.-P., Gorvel, J.-P. & Méresse, S. (2005).** The intracellular fate of *Salmonella* depends on the recruitment of kinesin. *Science* **308**, 1174–8.
- Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S. & Selander, R. K. (1996).** Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 804–8.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y. & Attree, I. (2009).** Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics* **10**, 104.
- Boyer, H. W. & Roulland-dussoix, D. (1969).** A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**, 459–472.
- Boyle, E. C., Brown, N. F. & Finlay, B. B. (2006).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol* **8**, 1946–1957.
- Braun, V., Wong, A., Landekic, M., Hong, W. J., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2010).** Sorting nexin 3 (SNX3) is a component of a tubular endosomal network induced by *Salmonella* and involved in maturation of the *Salmonella*-containing vacuole. *Cell Microbiol* **12**, 1352–67.
- Brawn, L. C., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2007).** *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* **1**, 63–75.
- Breeden, L. & Nasmyth, K. (1985).** Regulation of the Yeast HO Gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **50**, 643–650.
- Brennan, M. A. & Cookson, B. T. (2000).** *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**, 31–40.
- Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Kondowe, W., Chalira, C. & other authors. (2007).** Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *J Infect Dis* **195**, 895–904.
- Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A. & Finlay, B. B. (2005).** *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**, e32.

- Brown, N. F., Szeto, J., Jiang, X., Coombes, B. K., Finlay, B. B. & Brumell, J. H. (2006).** Mutational analysis of *Salmonella* translocated effector members SifA and SopD2 reveals domains implicated in translocation, subcellular localization and function. *Microbiology* **152**, 2323–43.
- Brown, N. F., Coombes, B. K., Bishop, J. L., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Boyle, E. C., Sanderson, K. L. & Finlay, B. B. (2011).** *Salmonella* phage ST64B encodes a member of the SseK/NleB effector family. *PLoS One* **6**, e17824.
- Browne, S. H., Lesnick, M. L. & Guiney, D. G. (2002).** Genetic requirements for *salmonella*-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* **70**, 7126–35.
- Browne, S. H., Hasegawa, P., Okamoto, S., Fierer, J. & Guiney, D. G. (2008).** Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 194–201. The Oxford University Press.
- Brumell, J. H., Tang, P., Zaharik, M. L. & Finlay, B. B. (2002).** Disruption of the *Salmonella*-containing vacuole leads to increased replication of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the cytosol of epithelial cells. *Infect Immun* **70**, 3264–70.
- Brunet, Y. R., Khodr, A., Logger, L., Aussel, L., Mignot, T., Rimsky, S. & Cascales, E. (2015).** H-NS Silencing of the *Salmonella* Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Interbacterial Killing. *Infect Immun* **83**, 2738–50. American Society for Microbiology (ASM).
- Bruno, V. M., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., Flavell, R. A., Kleinstein, S. H. & Galán, J. E. (2009).** *Salmonella* Typhimurium type III secretion effectors stimulate innate immune responses in cultured epithelial cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000538.
- Buchwald, G., Friebe, A., Galán, J. E., Hardt, W.-D., Wittinghofer, A. & Scheffzek, K. (2002).** Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J* **21**, 3286–95.
- Buckner, M. M. C., Croxen, M. A., Arena, E. T. & Finlay, B. B. (2011).** A comprehensive study of the contribution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SPI2 effectors to bacterial colonization, survival, and replication in typhoid fever, macrophage, and epithelial cell infection models. *Virulence* **2**, 208–16.
- Bujny, M. V., Ewels, P. A., Humphrey, S., Attar, N., Jepson, M. A. & Cullen, P. J. (2008).** Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *J Cell Sci* **121**, 2027–36.
- Bullock, W. O. (1987).** XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376–379.

- Bulmer, D. M., Kharraz, L., Grant, A. J., Dean, P., Morgan, F. J. E., Karavolos, M. H., Doble, A. C., McGhie, E. J., Koronakis, V. & other authors. (2012).** The bacterial cytoskeleton modulates motility, type 3 secretion, and colonization in *Salmonella*. *PLoS Pathog* **8**, e1002500.
- Bustamante, V. H. & Calva, E. (2014).** LeuO, a dormant sentinel for SPI-1? *Mol Microbiol* **91**, 1–3.
- Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. & Puente, J. L. (2008).** HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14591–6.
- Büttner, D. (2012).** Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 262–310.
- Cano, D. A., Martínez-Moya, M., Pucciarelli, M. G., Groisman, E. A., Casadesús, J. & García-Del Portillo, F. (2001).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**, 6463–74.
- Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B. & Lewis, S. (2009).** AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288–9.
- Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2011).** Analysis of the expression, secretion and translocation of the *Salmonella enterica* type III secretion system effector SteA. *PLoS One* **6**, e26930.
- Cardenal-Muñoz, E. & Ramos-Morales, F. (2013).** DsbA and MgrB regulate *steA* expression through the two-component system PhoQ/PhoP in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **195**, 2368–78.
- Cardenal-Muñoz, E., Gutiérrez, G. & Ramos-Morales, F. (2014).** Global impact of *Salmonella* type III secretion effector SteA on host cells. *Biochem Biophys Res Commun* **449**, 419–424.
- Carranza, G., Castaño, R., Fanarraga, M. L., Villegas, J. C., Gonçalves, J., Soares, H., Avila, J., Marenchino, M., Campos-Olivas, R. & other authors. (2013).** Autoinhibition of TBCB regulates EB1-mediated microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* **70**, 357–71.
- Carter, P. B. & Collins, F. M. (1974).** The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med* **139**, 1189–203.
- Cascales, E. (2008).** The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* **9**, 735–41.
- Catron, D. M., Sylvester, M. D., Lange, Y., Kadekoppala, M., Jones, B. D., Monack, D. M., Falkow, S. & Haldar, K. (2002).** The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol* **4**, 315–28.
- Chai, W., Ford, L. P., Lenertz, L., Wright, W. E. & Shay, J. W. (2002).** Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem* **277**, 47242–7.
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I. & Hensel, M. (2002).** *Salmonella*

- pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. *J Exp Med* **195**, 1155–66.
- Chakravortty, D., Rohde, M., Jäger, L., Deiwick, J. & Hensel, M. (2005).** Formation of a novel surface structure encoded by *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *EMBO J* **24**, 2043–52.
- Chan, Y. W., Fava, L. L., Uldschmid, A., Schmitz, M. H. A., Gerlich, D. W., Nigg, E. A. & Santamaria, A. (2009).** Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *J Cell Biol* **185**, 859–74.
- Chandran Darbari, V. & Waksman, G. (2015).** Structural Biology of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu Rev Biochem* **84**, 603–29.
- Chang, J., Chen, J. & Zhou, D. (2005).** Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of *Salmonella* SipC. *Mol Microbiol* **55**, 1379–89.
- Chen, L. M., Kaniga, K. & Galán, J. E. (1996).** *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* **21**, 1101–15.
- Chen, Z., Brand, N. J., Chen, A., Chen, S. J., Tong, J. H., Wang, Z. Y., Waxman, S. & Zelent, A. (1993).** Fusion between a novel *Krüppel*-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- α locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* **12**, 1161–7.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14.
- Chessa, D., Dorsey, C. W., Winter, M. & Baümeler, A. J. (2008).** Binding specificity of *Salmonella* plasmid-encoded fimbriae assessed by glycomics. *J Biol Chem* **283**, 8118–24.
- Choi, H. W., Brooking-Dixon, R., Neupane, S., Lee, C.-J., Miao, E. A., Staats, H. F. & Abraham, S. N. (2013).** *Salmonella typhimurium* impedes innate immunity with a mast-cell-suppressing protein tyrosine phosphatase, SptP. *Immunity* **39**, 1108–20.
- Choi, J., Shin, D., Yoon, H., Kim, J., Lee, C.-R., Kim, M., Seok, Y.-J. & Ryu, S. (2010).** *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIANtr-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20506–11.
- Chu, Y., S, G., T, W., J, Y., G, X., Y, L., H, N., R, H. & S, W. (2016).** A novel contribution of *spvB* to pathogenesis of *Salmonella* Typhimurium by inhibiting autophagy in host cells. *Oncotarget* **7**, 8295–8309.
- Chubiz, J. E. C., Golubeva, Y. A., Lin, D., Miller, L. D. & Slauch, J. M. (2010).** FliZ regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 invasion locus by controlling HilD protein activity in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **192**, 6261–70.
- Chun, K. T., Edenberg, H. J., Kelley, M. R. & Goebel, M. G. (1997).** Rapid amplification

- of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast* **13**, 233–40. John Wiley & Sons, Ltd.
- Chung, U. -i., Igarashi, T., Nishishita, T., Iwanari, H., Iwamatsu, A., Suwa, A., Mimori, T., Hata, K., Ebisu, S. & other authors. (1996).** The Interaction between Ku Antigen and REF1 Protein Mediates Negative Gene Regulation by Extracellular Calcium. *J Biol Chem* **271**, 8593–8598.
- Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M. & Falkow, S. (1998).** Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**, 175–88.
- Collazo, C. M. & Galán, J. E. (1997).** The invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium* directs the translocation of Sip proteins into the host cell. *Mol Microbiol* **24**, 747–56.
- Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K. & Neish, A. S. (2002).** Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* **169**, 2846–50.
- Cookson, B. T. & Brennan, M. A. (2001).** Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* **9**, 113–4.
- Coombes, B. K., Wickham, M. E., Lowden, M. J., Brown, N. F. & Finlay, B. B. (2005).** Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17460–5.
- Coombes, B. K., Brown, N. F., Valdez, Y., Brumell, J. H. & Finlay, B. B. (2004).** Expression and secretion of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes in response to acidification exhibit differential requirements of a functional type III secretion apparatus and SsaL. *J Biol Chem* **279**, 49804–49815.
- Cordero-Alba, M. & Ramos-Morales, F. (2014).** Patterns of expression and translocation of the ubiquitin ligase SlrP in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**, 3912–22.
- Cordero-Alba, M., Bernal-Bayard, J. & Ramos-Morales, F. (2012).** SrfJ, a *Salmonella* type III secretion system effector regulated by PhoP, RcsB, and IolR. *J Bacteriol* **194**, 4226–36.
- Cornelis, G. R. & Van Gijsegem, F. (2000).** Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**, 735–74.
- Cornelis, G. R. (2006).** The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811–25.
- Costa, T. R. D., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M. & Waksman, G. (2015).** Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* **13**, 343–59.
- Costoya, J. A., Hobbs, R. M. & Pandolfi, P. P. (2008).** Cyclin-dependent kinase antagonizes promyelocytic leukemia zinc-finger through phosphorylation. *Oncogene* **27**, 3789–96.
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar, M. de la L., Chapa-**

- Azuela, O., Alpuche-Aranda, C. & Gunn, J. S. (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4353–8.
- Crump, J. A., Luby, S. P. & Mintz, E. D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* **82**, 346–53.
- Dai, S., Zhang, Y., Weimbs, T., Yaffe, M. B. & Zhou, D. (2007). Bacteria-generated PtdIns(3)P recruits VAMP8 to facilitate phagocytosis. *Traffic* **8**, 1365–74.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–5.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J. E., Gleeson, C., Holden, D. W. & Hensel, M. (1998). Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol* **180**, 4775–80.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S. & Hensel, M. (1999). Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol Microbiol* **31**, 1759–73.
- Deiwick, J., Salcedo, S. P., Boucrot, E., Gilliland, S. M., Henry, T., Petermann, N., Waterman, S. R., Gorvel, J.-P., Holden, D. W. & Méresse, S. (2006). The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche. *Infect Immun* **74**, 6965–72.
- Desai, P. T., Porwollik, S., Long, F., Cheng, P., Wollam, A., Bhonagiri-Palsikar, V., Hallsworth-Pepin, K., Clifton, S. W., Weinstock, G. M. & McClelland, M. (2013). Evolutionary Genomics of *Salmonella enterica* Subspecies. *MBio* **4**.
- Dibb-Fuller, M. P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C. J. & Woodward, M. J. (1999). Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology* **145** (Pt 5), 1023–31.
- Diepold, A. & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**, 20150020–.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U. & Cornelis, G. R. (2010). Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* **29**, 1928–40.
- Dillon, S. C., Espinosa, E., Hokamp, K., Ussery, D. W., Casadesús, J. & Dorman, C. J. (2012). LeuO is a global regulator of gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **85**, 1072–89.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414–24.
- Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H. & Bäumler, A. J. (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**, 196–211.

- Drecktrah, D., Levine-Wilkinson, S., Dam, T., Winfree, S., Knodler, L. A., Schroer, T. A. & Steele-Mortimer, O. (2008).** Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells. *Traffic* **9**, 2117–29.
- Du, F. & Galán, J. E. (2009).** Selective inhibition of type III secretion activated signaling by the *Salmonella* effector AvrA. *PLoS Pathog* **5**, e1000595.
- Dunleavy, E. M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y. & Almouzni-Pettinotti, G. (2009).** HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* **137**, 485–97. Elsevier.
- Dutta, U., Garg, P. K., Kumar, R. & Tandon, R. K. (2000).** Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol* **95**, 784–7. The American College of Gastroenterology.
- Edwards, R. A., Olsen, G. J. & Maloy, S. R. (2002).** Comparative genomics of closely related salmonellae. *Trends Microbiol* **10**, 94–99. Elsevier.
- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A. & Slauch, J. M. (2002).** Construction of targeted single copy *lac* fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* **290**, 153–61.
- Ellermeier, C. D., Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2005).** HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**, 691–705.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2007).** Adaptation to the host environment: regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Curr Opin Microbiol* **10**, 24–9.
- Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2008).** Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J Bacteriol* **190**, 476–86.
- Elsinghorst, E. A. (1994).** Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* **236**, 405–20.
- Eriksson, S., Lucchini, S., Thompson, A., Rhen, M. & Hinton, J. C. D. (2002).** Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **47**, 103–118.
- Espinosa, E. & Casadesús, J. (2014).** Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by the LysR-type regulator LeuO. *Mol Microbiol* **91**, 1057–69.
- Eswarappa, S. M., Karnam, G., Nagarajan, A. G., Chakraborty, S. & Chakravorty, D. (2009).** *lac* repressor is an antivirulence factor of *Salmonella enterica*: its role in the evolution of virulence in *Salmonella*. *PLoS One* **4**, e5789. Public Library of Science.
- Fahlen, T. F., Mathur, N. & Jones, B. D. (2000).** Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional

- activator of *Salmonella typhimurium*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **28**, 25–35.
- Fan, E., Chauhan, N., Udatha, D. B. R. K. G., Leo, J. C. & Linke, D. (2016).** Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiol Spectr* **4**.
- Fass, E. & Groisman, E. A. (2009).** Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr Opin Microbiol* **12**, 199–204.
- Faucher, S. P., Viau, C., Gros, P.-P., Daigle, F. & Le Moual, H. (2008).** The *prpZ* gene cluster encoding eukaryotic-type Ser/Thr protein kinases and phosphatases is repressed by oxidative stress and involved in *Salmonella enterica* serovar Typhi survival in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **281**, 160–6. The Oxford University Press.
- Feldman, M. F. & Cornelis, G. R. (2003).** The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**, 151–8.
- Fell, V. L. & Schild-Poulter, C. (2015).** The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res* **763**, 15–29.
- Feng, X., Oropeza, R. & Kenney, L. J. (2003).** Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **48**, 1131–43.
- Figuerola-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. & Bossi, L. (2001).** Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**, 260–272.
- Filloux, A. (2004).** The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 163–79.
- Filloux, A., Hachani, A. & Bleves, S. (2008).** The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**, 1570–83. Microbiology Society.
- Fingerman, I. M., Li, H.-C. & Briggs, S. D. (2007).** A charge-based interaction between histone H4 and Dot1 is required for H3K79 methylation and telomere silencing: identification of a new trans-histone pathway. *Genes Dev* **21**, 2018–29.
- Fink, R. C., Evans, M. R., Porwollik, S., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Troxell, B., Libby, S. J., McClelland, M. & Hassan, H. M. (2007).** FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028s). *J Bacteriol* **189**, 2262–73.
- Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2005).** Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* **73**, 1907–16.
- Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2007).** Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* **9**, 2562–70.
- Folkesson, A., Löfdahl, S. & Normark, S. (2002).** The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**, 537–45.

- Foltz, D. R., Jansen, L. E. T., Bailey, A. O., Yates, J. R., Bassett, E. A., Wood, S., Black, B. E. & Cleveland, D. W. (2009).** Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* **137**, 472–84.
- Fortune, D. R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2006).** Identification of CsrC and characterization of its role in epithelial cell invasion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **74**, 331–9.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.-D., Ozören, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J. & other authors. (2006).** Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 β in *Salmonella*-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**, 576–82.
- Freter, R., O'Brien, P. C. & Macsai, M. S. (1981).** Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. *Infect Immun* **34**, 234–40.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. & Hardt, W. D. (2001).** SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**, 34035–40.
- Fronzes, R., Christie, P. J. & Waksman, G. (2009).** The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**, 703–14.
- Fu, Y. & Galán, J. E. (1998).** Identification of a specific chaperone for SptP, a substrate of the centisome 63 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **180**, 3393–9.
- Fu, Y. & Galán, J. E. (1999).** A *salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* **401**, 293–7.
- Galan, J. E. & Zhou, D. (2000).** Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8754–61.
- Galán, J. E. (1996).** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol Microbiol* **20**, 263–71.
- Galán, J. E. (1999).** Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. *Curr Opin Microbiol* **2**, 46–50.
- Galán, J. E. (2001).** *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 53–86.
- Galán, J. E. & Wolf-Watz, H. (2006).** Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567–73.
- Galán, J. E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T. C. & Wagner, S. (2014).** Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* **68**, 415–38.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J. C. & Van Immerseel, F. (2006).** Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol* **72**, 946–9.

- García-Calderón, C. B., Casadesús, J. & Ramos-Morales, F. (2007).** Rcs and PhoPQ regulatory overlap in the control of *Salmonella enterica* virulence. *J Bacteriol* **189**, 6635–44.
- García-Calderón, C. B., García-Quintanilla, M., Casadesús, J. & Ramos-Morales, F. (2005).** Virulence attenuation in *Salmonella enterica* *rscC* mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology* **151**, 579–588.
- García-del Portillo, F., Zwick, M. B., Leung, K. Y. & Finlay, B. B. (1993).** *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10544–8.
- García-Del Portillo, F., Pucciarelli, M. G. & Casadesús, J. (1999).** DNA adenine methylase mutants of *Salmonella typhimurium* show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11578–83.
- Geddes, K., Worley, M., Niemann, G. & Heffron, F. (2005).** Identification of new secreted effectors in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **73**, 6260–71.
- Geddes, K., Cruz, F. & Heffron, F. (2007).** Analysis of cells targeted by *Salmonella* type III secretion in vivo. *PLoS Pathog* **3**, e196.
- Geibel, S. & Waksman, G. (2014).** The molecular dissection of the chaperone-usher pathway. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1559–67. Elsevier B.V.
- Gerlach, R. G. & Hensel, M. (2007).** Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401–15.
- Gerlach, R. G., Jäckel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W.-D. & Hensel, M. (2007).** *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**, 1834–50.
- Gerlach, R. G., Cláudio, N., Rohde, M., Jäckel, D., Wagner, C. & Hensel, M. (2008).** Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**, 2364–76.
- Ghosh, P. (2004).** Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 771–95.
- Giacomodonato, M. N., Uzzau, S., Bacciu, D., Caccuri, R., Sarnacki, S. H., Rubino, S. & Cerquetti, M. C. (2007).** SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* **153**, 1221–8. Microbiology Society.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. & Ullmann, A. (1988).** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med* **13 Suppl**, 239–52.
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenbergh, H. H., van Aalderen, M. & Heyting, C. (1999).** Mre11 and Ku70 interact in somatic cells,

- but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **23**, 194–8.
- Gold, V. A. M., Duong, F. & Collinson, I. (2007).** Structure and function of the bacterial Sec translocon. *Mol Membr Biol* **24**, 387–94.
- Golubeva, Y. A., Sadik, A. Y., Ellermeier, J. R. & Slauch, J. M. (2012).** Integrating global regulatory input into the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system. *Genetics* **190**, 79–90.
- Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Cott Chubiz, J. E. & Slauch, J. M. (2015).** Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. *MBio* **7**, e02170–15–.
- Gong, H., Su, J., Bai, Y., Miao, L., Kim, K., Yang, Y., Liu, F. & Lu, S. (2009).** Characterization of the expression of *Salmonella* Type III secretion system factor PrgI, SipA, SipB, SopE2, SpaO, and SptP in cultures and in mice. *BMC Microbiol* **9**, 73.
- Gonzalez-Begne, M., Lu, B., Han, X., Hagen, F. K., Hand, A. R., Melvin, J. E. & Yates, J. R. (2009).** Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* **8**, 1304–14.
- Gonzalo-Asensio, J., Ortega, A. D., Rico-Pérez, G., Pucciarelli, M. G. & García-Del Portillo, F. (2013).** A novel antisense RNA from the *Salmonella* virulence plasmid pSLT expressed by non-growing bacteria inside eukaryotic cells. *PLoS One* **8**, e77939.
- Govoni, G. & Gros, P. (1998).** Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* **47**, 277–84.
- Grimont, F., Lejay-Collin, M., Talukder, K. A., Carle, I., Issenhuth, S., Le Roux, K. & Grimont, P. A. D. (2007).** Identification of a group of *Shigella*-like isolates as *Shigella boydii* 20. *J Med Microbiol* **56**, 749–54. Microbiology Society.
- Groisman, E. A. (2001).** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol* **183**, 1835–42.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1994).** How to become a pathogen. *Trends Microbiol* **2**, 289–94.
- Groisman, E. A. & Ochman, H. (1997).** How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343–9.
- Groisman, E. A., Chiao, E., Lipps, C. J. & Heffron, F. (1989).** *Salmonella typhimurium* *phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7077–81.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M. & Gros, P. (1997).** Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* **185**, 717–30.
- Grund, S. & Weber, A. (1988).** A New Type of Fimbriae on *Salmonella typhimurium*. *J Vet Med Ser B* **35**, 779–782.
- Guiney, D. G. (2005).** The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr Top Microbiol Immunol* **289**, 131–50.

- Guiney, D. G. & Fierer, J. (2011).** The Role of the *spv* Genes in *Salmonella* Pathogenesis. *Front Microbiol* **2**, 129.
- Gulig, P. A., Danbara, H., Guiney, D. G., Lax, A. J., Norel, F. & Rhen, M. (1993).** Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**, 825–30.
- Habyarimana, F., Sabag-Daigle, A. & Ahmer, B. M. M. (2014).** The SdiA-regulated gene *srgE* encodes a type III secreted effector. *J Bacteriol* **196**, 2301–12.
- Hallstrom, K. N. & McCormick, B. A. (2016).** The type three secreted effector SipC regulates the trafficking of PERP during *Salmonella* infection. *Gut Microbes* **7**, 136–45.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–80.
- Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. (1991).** Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63–113.
- Hansen-Wester, I. & Hensel, M. (2001).** *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**, 549–59.
- Hapfelmeier, S. & Hardt, W.-D. (2005).** A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* **13**, 497–503.
- Haraga, A. & Miller, S. I. (2003).** A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun* **71**, 4052–8.
- Haraga, A. & Miller, S. I. (2006).** A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol* **8**, 837–46.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. & Miller, S. I. (2008).** *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53–66.
- Hardt, W. D., Chen, L. M., Schuebel, K. E., Bustelo, X. R. & Galán, J. E. (1998).** *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* **93**, 815–26.
- Hautefort, I., Thompson, A., Eriksson-Ygberg, S., Parker, M. L., Lucchini, S., Danino, V., Bongaerts, R. J. M., Ahmad, N., Rhen, M. & Hinton, J. C. D. (2008a).** During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell Microbiol* **10**, 958–84.
- Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2002).** Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol* **12**, 15–20.
- Hayward, R. D., Cain, R. J., McGhie, E. J., Phillips, N., Garner, M. J. & Koronakis, V. (2005).** Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. *Mol Microbiol* **56**, 590–603.
- Hedegaard, L. & Danchin, A. (1985).** The *cya* gene region of *Erwinia chrysanthemi* B374: organisation and gene products. *MGG Mol Gen Genet* **201**, 38–42.

- Henderson, I. R. & Nataro, J. P. (2001).** Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**, 1231–43.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P. & other authors. (2006).** The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13497–502.
- Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G. & Berks, B. C. (1999).** The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **32**, 275–287.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Gori, N., Falkow, S. & Zychlinsky, A. (1999).** The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396–401.
- Ho, B. T., Dong, T. G. & Mekalanos, J. J. (2014).** A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe* **15**, 9–21.
- Ho, T. D. & Starnbach, M. N. (2005).** The *Salmonella enterica* serovar typhimurium-encoded type III secretion systems can translocate *Chlamydia trachomatis* proteins into the cytosol of host cells. *Infect Immun* **73**, 905–11.
- Hobbie, S., Chen, L. M., Davis, R. J. & Galán, J. E. (1997).** Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* **159**, 5550–9.
- Hooser, A. A. Van, Ouspenski, I. I., Gregson, H. C., Starr, D. A., Yen, T. J., Goldberg, M. L., Yokomori, K., Earnshaw, W. C., Sullivan, K. F. & Brinkley, B. R. (2001).** Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J Cell Sci* **114**, 3529–3542.
- Hu, H., Liu, Y., Wang, M., Fang, J., Huang, H., Yang, N., Li, Y., Wang, J., Yao, X. & other authors. (2011).** Structure of a CENP-A-histone H4 heterodimer in complex with chaperone HJURP. *Genes Dev* **25**, 901–6.
- Humphreys, D., Davidson, A., Hume, P. J. & Koronakis, V. (2012).** *Salmonella* virulence effector SopE and Host GEF ARNO cooperate to recruit and activate WAVE to trigger bacterial invasion. *Cell Host Microbe* **11**, 129–39. Elsevier Inc.
- Hurley, D., McCusker, M. P., Fanning, S. & Martins, M. (2014).** *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Front Immunol* **5**, 481. Frontiers.
- Ibarra, J. A., Knodler, L. A., Sturdevant, D. E., Virtaneva, K., Carmody, A. B., Fischer, E. R., Porcella, S. F. & Steele-Mortimer, O. (2010).** Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions in vitro. *Microbiology* **156**, 1120–33.
- Ivins, S., Pemberton, K., Guidez, F., Howell, L., Krumlauf, R. & Zelent, A. (2003).** Regulation of *Hoxb2* by APL-associated PLZF protein. *Oncogene* **22**, 3685–97.
- Janssen, R., van der Straaten, T., van Diepen, A. & van Dissel, J. T. (2003).** Responses

- to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Microbes Infect* **5**, 527–34.
- Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K. & Felsenfeld, G. (2009).** H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark ‘nucleosome-free regions’ of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* **41**, 941–5.
- Jolly, C., Winfree, S., Hansen, B. & Steele-Mortimer, O. (2014).** The Annexin A2/p11 complex is required for efficient invasion of *Salmonella* Typhimurium in epithelial cells. *Cell Microbiol* **16**, 64–77. NIH Public Access.
- Jones, B. D., Ghorri, N. & Falkow, S. (1994).** *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer’s patches. *J Exp Med* **180**, 15–23.
- Jones, B. D. (2005).** *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *J Microbiol* **43 Spec No**, 110–7.
- Jones, M. A., Wood, M. W., Mullan, P. B., Watson, P. R., Wallis, T. S. & Galyov, E. E. (1998).** Secreted effector proteins of *Salmonella dublin* act in concert to induce enteritis. *Infect Immun* **66**, 5799–804.
- Kaniga, K., Trollinger, D. & Galan, J. E. (1995).** Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the Shigella IpaD and IpaA proteins. *J Bacteriol* **177**, 7078–7085.
- Kato, D., Osakabe, A., Tachiwana, H., Tanaka, H. & Kurumizaka, H. (2015).** Human tNASP promotes in vitro nucleosome assembly with histone H3.3. *Biochemistry* **54**, 1171–9. American Chemical Society.
- Kelly, A., Goldberg, M. D., Carroll, R. K., Danino, V., Hinton, J. C. D. & Dorman, C. J. (2004).** A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* **150**, 2037–53. Microbiology Society.
- Kershner, E., Wu, S. Y. & Chiang, C. M. (1998).** Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes. *J Biol Chem* **273**, 34444–34453.
- Khaleghpour, K., Svitkin, Y. V., Craig, A. W., DeMaria, C. T., Deo, R. C., Burley, S. K. & Sonenberg, N. (2001).** Translational Repression by a Novel Partner of Human Poly(A) Binding Protein, Paip2. *Mol Cell* **7**, 205–216. Elsevier.
- Khazak, V., Estojak, J., Cho, H., Majors, J., Sonoda, G., Testa, J. R. & Golemis, E. A. (1998).** Analysis of the interaction of the novel RNA polymerase II (pol II) subunit hSRPB4 with its partner hSRPB7 and with pol II. *Mol Cell Biol* **18**, 1935–45.
- Kier, L. D., Weppelman, R. M. & Ames, B. N. (1979).** Regulation of nonspecific acid phosphatase in *Salmonella*: *phoN* and *phoP* genes. *J Bacteriol* **138**, 155–61.
- Kim, B. H., Kim, H. G., Kim, J. S., Jang, J. I. & Park, Y. K. (2007).** Analysis of functional domains present in the N-

- terminus of the SipB protein. *Microbiology* **153**, 2998–3008.
- Kim, E., Li, K., Lieu, C., Tong, S., Kawai, S., Fukutomi, T., Zhou, Y., Wands, J. & Li, J. (2008).** Expression of apolipoprotein C-IV is regulated by Ku antigen/peroxisome proliferator-activated receptor gamma complex and correlates with liver steatosis. *J Hepatol* **49**, 787–98.
- Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthöft, T. & Kagnoff, M. F. (1998).** Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* **102**, 1815–23.
- Kingsley, R. A., van Amsterdam, K., Kramer, N. & Bäumler, A. J. (2000).** The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun* **68**, 2720–7.
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Kestra, A. M., Adams, L. G. & Baumler, A. J. (2002).** *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* **43**, 895–905.
- Kiss, T., Morgan, E. & Nagy, G. (2007).** Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett* **275**, 153–9.
- Knodler, L. A. (2015).** *Salmonella enterica*: living a double life in epithelial cells. *Curr Opin Microbiol* **23**, 23–31.
- Knodler, L. A. & Steele-mortimer, O. (2005).** Effector PipB2 Affects Late Endosome/Lysosome Distribution to Mediate. *Mol Biol Cell* **16**, 4108–4123.
- Knodler, L. a, Celli, J., Hardt, W.-D., Vallance, B. a, Yip, C. & Finlay, B. B. (2002).** *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol Microbiol* **43**, 1089–103.
- Knodler, L. A., Vallance, B. A., Hensel, M., Jäckel, D., Finlay, B. B. & Steele-Mortimer, O. (2003).** *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* **49**, 685–704.
- Knodler, L. A., Finlay, B. B. & Steele-Mortimer, O. (2005).** The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* **280**, 9058–64.
- Knodler, L. a, Vallance, B. a, Celli, J., Winfree, S., Hansen, B., Montero, M. & Steele-Mortimer, O. (2010).** Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17733–8.
- Knodler, L. A., Vallance, B. A., Hensel, M., Jäckel, D., Finlay, B. B. & Steele-Mortimer, O. (2004).** *Salmonella* type III effectors PipB and PipB2 are targeted to detergent-resistant microdomains on internal host cell membranes. *Mol Microbiol* **49**, 685–704.
- Koken, M. H., Reid, A., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Davies, J. M., Kabarowski, J. H., Zhu, J., Dong, S., Chen, S. & other authors. (1997).** Leukemia-associated retinoic acid receptor alpha fusion partners,

- PML and PLZF, heterodimerize and colocalize to nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10255–60.
- Koronakis, V., Hughes, C. & Koronakis, E. (1991).** Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. *EMBO J* **10**, 3263–72.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M. & Hol, W. G. J. (2012).** The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* **10**, 336–51.
- Kozlov, G., De Crescenzo, G., Lim, N. S., Siddiqui, N., Fantus, D., Kahvejian, A., Trempe, J.-F., Elias, D., Ekiel, I. & other authors. (2004).** Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J* **23**, 272–81.
- Kröger, C., Dillon, S. C., Cameron, A. D. S., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., Chao, Y., Sittka, A., Hébrard, M. & other authors. (2012).** The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E1277–86.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S. I. (1998).** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602–5.
- Kubori, T. & Nagai, H. (2015).** The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr Opin Microbiol* **29**, 22–29.
- Kujat Choy, S. L., Boyle, E. C., Gal-Mor, O., Goode, D. L., Valdez, Y., Vallance, B. A. & Finlay, B. B. (2004).** SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* **72**, 5115–25.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
- Lai, C. W., Chan, R. C., Cheng, A. F., Sung, J. Y. & Leung, J. W. (1992).** Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. *Am J Gastroenterol* **87**, 1198–9.
- Lalitha, M. K. & John, R. (1994).** Unusual manifestations of salmonellosis—a surgical problem. *Q J Med* **87**, 301–9.
- Lambert, M. A. & Smith, S. G. J. (2008).** The PagN protein of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an adhesin and invasin. *BMC Microbiol* **8**, 142.
- Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X. & Galán, J. E. (2011).** A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science* **331**, 1188–91.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Penadés, J. R. & Lasa, I. (2005).** BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**, 1322–39.
- Lawhon, S. D., Khare, S., Rossetti, C. A., Everts, R. E., Galindo, C. L., Luciano, S. A., Figueiredo, J. F., Nunes, J. E. S., Gull, T. & other authors. (2011).** Role of

- SPI-1 secreted effectors in acute bovine response to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: a systems biology analysis approach. *PLoS One* **6**, e26869.
- Lawhon, S. D., Maurer, R., Suyemoto, M. & Altier, C. (2002).** Intestinal short-chain fatty acids alter *Salmonella typhimurium* invasion gene expression and virulence through BarA/SirA. *Mol Microbiol* **46**, 1451–1464.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R. & Monack, D. M. (2006).** Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**, e11.
- Lee, A. K., Detweiler, C. S. & Falkow, S. (2000).** OmpR regulates the two-component system SsrA-ssrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J Bacteriol* **182**, 771–81.
- Lee, C. A. & Falkow, S. (1990).** The ability of *Salmonella* to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4304–8.
- Lee, P.-C. & Rietsch, A. (2015).** Fueling type III secretion. *Trends Microbiol* **23**, 296–300. Elsevier.
- Lee, S. H. & Galán, J. E. (2003).** InvB is a type III secretion-associated chaperone for the *Salmonella enterica* effector protein SopE. *J Bacteriol* **185**, 7279–84.
- Lee, S. H. & Galán, J. E. (2004).** *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**, 483–95.
- Lesnick, M. L., Reiner, N. E., Fierer, J. & Guiney, D. G. (2001).** The *Salmonella* spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **39**, 1464–70.
- Li, Y., Wang, T., Gao, S., Xu, G., Niu, H., Huang, R. & Wu, S. (2016).** *Salmonella* plasmid virulence gene *spvB* enhances bacterial virulence by inhibiting autophagy in a zebrafish infection model. *Fish Shellfish Immunol* **49**, 252–259.
- Liao, A. P., Petrof, E. O., Kuppireddi, S., Zhao, Y., Xia, Y., Claud, E. C. & Sun, J. (2008).** *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS One* **3**, e2369.
- Libby, S. J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E. & Guiney, D. G. (2000).** The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* **2**, 49–58.
- Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A. J., Szabó, G., Rual, J.-F., Fisk, C. J., Li, N., Smolyar, A. & other authors. (2006a).** A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* **125**, 801–14. Elsevier.
- Lim, S., Kim, B., Choi, H.-S., Lee, Y. & Ryu, S. (2006b).** Fis is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **41**, 33–42.
- Lim, S., Yun, J., Yoon, H., Park, C., Kim, B., Jeon, B., Kim, D. & Ryu, S. (2007).** Mlc

- regulation of *Salmonella* pathogenicity island I gene expression via *hile* repression. *Nucleic Acids Res* **35**, 1822–32.
- Lin, D., Rao, C. V. & Slauch, J. M. (2008).** The *Salmonella* SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. *J Bacteriol* **190**, 87–97.
- Liu, J. M., Zhang, M. J., Zhao, L., Cui, B., Li, Z. Bin, Zhao, H. Y., Sun, L. H., Tao, B., Li, M. & Ning, G. (2010).** Analysis of recently identified osteoporosis susceptibility genes in Han Chinese women. *J Clin Endocrinol Metab* **95**, 112–120.
- Liu, T. M., Guo, X. M., Tan, H. S., Hui, J. H., Lim, B. & Lee, E. H. (2011).** Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* **63**, 2711–2720.
- Liu, T. M., Lee, E. H., Lim, B. & Shyh-Chang, N. (2015).** Balancing Stem Cell Self-renewal and Differentiation with PLZF. *Stem Cells*.
- Liu, X., Lu, R., Xia, Y., Wu, S. & Sun, J. (2010b).** Eukaryotic signaling pathways targeted by *Salmonella* effector protein AvrA in intestinal infection in vivo. *BMC Microbiol* **10**, 326.
- Llosa, M., Roy, C. & Dehio, C. (2009).** Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* **73**, 141–51.
- Lloyd, S. A., Norman, M., Rosqvist, R. & Wolf-Watz, H. (2001).** *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**, 520–31.
- Lockman, H. A. & Curtiss, R. (1992).** Isolation and characterization of conditional adherent and non-type 1 fimbriated *Salmonella typhimurium* mutants. *Mol Microbiol* **6**, 933–945.
- López-Garrido, J. & Casadesús, J. (2010).** Regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by DNA adenine methylation. *Genetics* **184**, 637–49.
- López-Garrido, J. & Casadesús, J. (2012).** Crosstalk between virulence loci: regulation of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 (SPI-1) by products of the *std* fimbrial operon. *PLoS One* **7**, e30499.
- Loquet, A., Sgourakis, N. G., Gupta, R., Giller, K., Riedel, D., Goosmann, C., Griesinger, C., Kolbe, M., Baker, D. & other authors. (2012).** Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* **486**, 276–9.
- Lorain, S., Quivy, J. P., Monier-Gavelle, F., Scamps, C., Lécluse, Y., Almouzni, G. & Lipinski, M. (1998).** Core histones and HIRIP3, a novel histone-binding protein, directly interact with WD repeat protein HIRA. *Mol Cell Biol* **18**, 5546–56.
- Lucas, R. L., Lostroh, C. P., DiRusso, C. C., Spector, M. P., Wanner, B. L. & Lee, C. A. (2000).** Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol* **182**, 1872–82.

- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M. D., Hurd, D., Harrison, M. & Hinton, J. C. D. (2006).** H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* 2, e81.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A. & Baccarini, M. (1999).** Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* 181, 3433–7.
- Lunelli, M., Hurwitz, R., Lambers, J. & Kolbe, M. (2011).** Crystal structure of PrgI-SipD: insight into a secretion competent state of the type three secretion system needle tip and its interaction with host ligands. *PLoS Pathog* 7, e1002163.
- Lyu, J. & Joo, C. K. (2005).** Wnt-7a up-regulates matrix metalloproteinase-12 expression and promotes cell proliferation in corneal epithelial cells during wound healing. *J Biol Chem* 280, 21653–21660.
- Macián, F., Pérez-Roger, I. & Armengod, M. E. (1994).** An improved vector system for constructing transcriptional *lacZ* fusions: analysis of regulation of the *dnaA*, *dnaN*, *recF* and *gyrB* genes of *Escherichia coli*. *Gene* 145, 17–24.
- Macnab, R. M. (2003).** How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57, 77–100. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Malik-Kale, P., Jolly, C. E., Lathrop, S., Winfree, S., Luterbach, C. & Steele-Mortimer, O. (2011).** *Salmonella* - at home in the host cell. *Front Microbiol* 2, 125.
- Mallo, G. V, Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Alemán, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. & Brumell, J. H. (2008).** SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol* 182, 741–52.
- Maloy, S. R. (1990).** *Experimental Techniques in Bacterial Genetics*.
- Maloy, S. R. (1996).** Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria 1–4.
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Cróinín, T. O., Hinton, J. C. D. & Dorman, C. J. (2006).** The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 59, 1831–47.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Lara-Tejero, M., Thomas, D., Unger, V. M. & Galán, J. E. (2006).** Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature* 441, 637–40.
- Martínez, L. C., Yakhnin, H., Camacho, M. I., Georgellis, D., Babitzke, P., Puente, J. L. & Bustamante, V. H. (2011).** Integration of a complex regulatory cascade involving the SirA/BarA and Csr global regulatory systems that controls expression of the *Salmonella* SPI-1 and SPI-2 virulence regulons through HilD. *Mol Microbiol* 80, 1637–56.
- Martínez, L. C., Banda, M. M., Fernández-Mora, M., Santana, F. J. & Bustamante, V. H. (2014).** HilD induces expression of *Salmonella* pathogenicity island 2 genes by

- displacing the global negative regulator H-NS from *ssrAB*. *J Bacteriol* **196**, 3746–55.
- Marzesco, A. M., Galli, T., Louvard, D. & Zahraoui, A. (1998).** The rod cGMP phosphodiesterase δ subunit dissociates the small GTPase Rab13 from membranes. *J Biol Chem* **273**, 22340–22345.
- Mathew, R., Seiler, M. P., Scanlon, S. T., Mao, A., Constantinides, M. G., Bertozzi-Villa, C., Singer, J. D. & Bendelac, A. (2012).** BTB-ZF factors recruit the E3 ligase cullin 3 to regulate lymphoid effector programs. *Nature* **491**, 618–21.
- Mazar, J. & Cotter, P. A. (2007).** New insight into the molecular mechanisms of two-partner secretion. *Trends Microbiol* **15**, 508–15.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M. & other authors. (2001).** Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852–6.
- McCormick, B. A., Colgan, S. P., Delp-Archer, C., Miller, S. I. & Madara, J. L. (1993).** *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol* **123**, 895–907.
- McCormick, M. B., Tamimi, R. M., Snider, L., Asakura, A., Bergstrom, D. & Tapscott, S. J. (1996).** NeuroD2 and neuroD3: distinct expression patterns and transcriptional activation potentials within the neuroD gene family. *Mol Cell Biol* **16**, 5792–800.
- McDermott, J. E., Corrigan, A., Peterson, E., Oehmen, C., Niemann, G., Cambronne, E. D., Sharp, D., Adkins, J. N., Samudrala, R. & Heffron, F. (2011).** Computational prediction of type III and IV secreted effectors in gram-negative bacteria. *Infect Immun* **79**, 23–32.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2001).** Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. *EMBO J* **20**, 2131–9.
- McGhie, E. J., Hayward, R. D. & Koronakis, V. (2004).** Control of actin turnover by a *salmonella* invasion protein. *Mol Cell* **13**, 497–510.
- McLaughlin, L. M., Xu, H., Carden, S. E., Fisher, S., Reyes, M., Heilshorn, S. C. & Monack, D. M. (2014).** A microfluidic-based genetic screen to identify microbial virulence factors that inhibit dendritic cell migration. *Integr Biol (Camb)* **6**, 438–49.
- McQuiston, J. R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F. & Fields, P. I. (2004).** Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* **42**, 1923–32.
- Mesquita, F. S., Thomas, M., Sachse, M., Santos, A. J. M., Figueira, R. & Holden, D. W. (2012).** The *Salmonella* Deubiquitinase SseL Inhibits Selective Autophagy of Cytosolic Aggregates. *PLoS Pathog* **8**, e1002743.
- Miao, E. A., Freeman, J. A. & Miller, S. I. (2002).** Transcription of the SsrAB regulon is repressed by alkaline pH and is

- p independent of PhoPQ and magnesium concentration.
- J Bacteriol*
- 184**
- , 1493–7.
- Miao, E. A., Brittnacher, M., Haraga, A., Jeng, R. L., Welch, M. D. & Miller, S. I. (2003).** *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **48**, 401–15.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. & Aderem, A. (2006).** Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1 β via Ipaf. *Nat Immunol* **7**, 569–75.
- Miao, E. A., Andersen-Nissen, E., Warren, S. E. & Aderem, A. (2007).** TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* **29**, 275–88.
- Miao, E. A., Mao, D. P., Yudkovsky, N., Bonneau, R., Lorang, C. G., Warren, S. E., Leaf, I. A. & Aderem, A. (2010).** Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3076–80.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, S. I. & Mekalanos, J. J. (1990).** Constitutive expression of the phoP regulon attenuates *Salmonella* virulence and survival within macrophages. *J Bacteriol* **172**, 2485–90.
- Miller, S. I., Kukral, A. M. & Mekalanos, J. J. (1989).** A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5054–8.
- Misselwitz, B., Kreibich, S. K., Rout, S., Stecher, B., Periaswamy, B. & Hardt, W.-D. (2011).** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium binds to HeLa cells via Fim-mediated reversible adhesion and irreversible type three secretion system 1-mediated docking. *Infect Immun* **79**, 330–41.
- Moest, T. P. & Méresse, S. (2013).** *Salmonella* T3SSs: successful mission of the secret(ion) agents. *Curr Opin Microbiol* **16**, 38–44.
- Molinari, F., Foulquier, F., Tarpey, P. S., Morelle, W., Boissel, S., Teague, J., Edkins, S., Futreal, P. A., Stratton, M. R. & other authors. (2008).** Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**, 1150–7.
- Monack, D. M., Navarre, W. W. & Falkow, S. (2001).** *Salmonella*-induced macrophage death: the role of caspase-1 in death and inflammation. *Microbes Infect* **3**, 1201–12.
- Monack, D. M., Bouley, D. M. & Falkow, S. (2004).** *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected *Nramp1*^{+/+} mice and can be reactivated by IFN γ neutralization. *J Exp Med* **199**, 231–41.
- Montagne, M., Martel, A. & Le Moual, H. (2001).** Characterization of the catalytic activities of the PhoQ histidine protein kinase of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **183**, 1787–91.

- Morgan, E., Bowen, A. J., Carnell, S. C., Wallis, T. S. & Stevens, M. P. (2007).** SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* **75**, 1524–33.
- Morgenstern, J. P. & Land, H. (1990).** Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**, 3587–96.
- Morita-Ishihara, T., Ogawa, M., Sagara, H., Yoshida, M., Katayama, E. & Sasakawa, C. (2006).** *Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery. *J Biol Chem* **281**, 599–607.
- Morpeth, S. C., Ramadhani, H. O. & Crump, J. A. (2009).** Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin Infect Dis* **49**, 606–11.
- Mostafavi, S., Ray, D., Warde-Farley, D., Grouios, C. & Morris, Q. (2008).** GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol* **9 Suppl 1**, S4.
- Mota, L. J., Ramsden, A. E., Liu, M., Castle, J. D. & Holden, D. W. (2009).** SCAMP3 is a component of the *Salmonella*-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-Golgi trafficking. *Cell Microbiol* **11**, 1236–53.
- Mouslim, C., Delgado, M. & Groisman, E. A. (2004).** Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Mol Microbiol* **54**, 386–95.
- Mulder, D. T., McPhee, J. B., Reid-Yu, S. A., Stogios, P. J., Savchenko, A. & Coombes, B. K. (2015).** Multiple histidines in the periplasmic domain of the *Salmonella enterica* sensor kinase SsrA enhance signaling in response to extracellular acidification. *Mol Microbiol* **95**, 678–91.
- Müller, A. J., Kaiser, P., Dittmar, K. E. J., Weber, T. C., Haueter, S., Endt, K., Songhet, P., Zellweger, C., Kremer, M. & other authors. (2012).** *Salmonella* gut invasion involves TTSS-2-dependent epithelial traversal, basolateral exit, and uptake by epithelium-sampling lamina propria phagocytes. *Cell Host Microbe* **11**, 19–32. Elsevier.
- Myeni, S. K. & Zhou, D. (2010).** The C terminus of SipC binds and bundles F-actin to promote *Salmonella* invasion. *J Biol Chem* **285**, 13357–63.
- Navarre, W. W., Halsey, T. A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J. L., Kenney, L. J., Gunn, J. S., Fang, F. C. & Libby, S. J. (2005).** Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Mol Microbiol* **56**, 492–508.
- Nawabi, P., Catron, D. M. & Haldar, K. (2008).** Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular *Salmonella* infection. *Mol Microbiol* **68**, 173–85.
- Neeb, A., Wallbaum, S., Novac, N., Dukovic-Schulze, S., Scholl, I., Schreiber, C., Schlag, P., Moll, J., Stein, U. & Sleeman,**

- J. P. (2012). The immediate early gene Ier2 promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. *Oncogene* **31**, 3796–806. Macmillan Publishers Limited.
- Le Negrate, G., Faustin, B., Welsh, K., Loeffler, M., Krajewska, M., Hasegawa, P., Mukherjee, S., Orth, K., Krajewski, S. & other authors. (2008). *Salmonella* secreted factor L deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* inhibits NF-kappaB, suppresses IkappaBalpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J Immunol* **180**, 5045–56.
- Nichols, C. D. & Casanova, J. E. (2010). *Salmonella*-directed recruitment of new membrane to invasion foci via the host exocyst complex. *Curr Biol* **20**, 1316–20.
- Niemann, G. S., Brown, R. N., Mushamiri, I. T., Nguyen, N. T., Taiwo, R., Stufkens, A., Smith, R. D., Adkins, J. N., McDermott, J. E. & Heffron, F. (2013). RNA type III secretion signals that require Hfq. *J Bacteriol* **195**, 2119–25.
- Nieto, P. A., Pardo-Roa, C., Salazar-Echegarai, F. J., Tobar, H. E., Coronado, I., Riedel, C. A., Kalergis, A. M. & Bueno, S. M. (2016). New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes Infect.*
- Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J. A., Schröder, W., Miller, S. I. & Hensel, M. (2001). SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol* **183**, 6036–45.
- Norris, F. A., Wilson, M. P., Wallis, T. S., Galyov, E. E. & Majerus, P. W. (1998). SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14057–9.
- Núñez-Hernández, C., Alonso, A., Pucciarelli, M. G., Casadesús, J. & García-del Portillo, F. (2014). Dormant intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium discriminates among *Salmonella* pathogenicity island 2 effectors to persist inside fibroblasts. *Infect Immun* **82**, 221–32.
- O'Connor, M. S., Safari, A., Liu, D., Qin, J. & Songyang, Z. (2004). The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* **279**, 28585–28591.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F. & Groisman, E. A. (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7800–4.
- Ohlson, M. B., Fluhr, K., Birmingham, C. L., Brumell, J. H. & Miller, S. I. (2005). SseJ deacylase activity by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes virulence in mice. *Infect Immun* **73**, 6249–59.
- Ohlson, M. B., Huang, Z., Alto, N. M., Blanc, M.-P., Dixon, J. E., Chai, J. & Miller, S. I. (2008). Structure and function of *Salmonella* SifA indicate that its interactions with SKIP, SseJ, and RhoA family GTPases induce endosomal tubulation. *Cell Host Microbe* **4**, 434–46.

- Olekhnovich, I. N. & Kadner, R. J. (2002).** DNA-binding activities of the HilC and HilD virulence regulatory proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 4148–60.
- Olekhnovich, I. N. & Kadner, R. J. (2006).** Crucial roles of both flanking sequences in silencing of the *hilA* promoter in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol* **357**, 373–86.
- Omori, K. & Idei, A. (2003).** Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J Biosci Bioeng* **95**, 1–12.
- Osborne, S. E. & Coombes, B. K. (2011).** Transcriptional priming of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 precedes cellular invasion. *PLoS One* **6**, e21648.
- Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H. & Ogasawara, N. (2006).** *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* **13**, 141–53.
- Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L. & Kagnoff, M. F. (2002).** Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 771–781.
- Parkhill, J., Dougan, G., James, K. D., Thomson, N. R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K. L., Bentley, S. D. & other authors. (2001).** Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* **413**, 848–52.
- Parry, C. M., Hien, T. T., Dougan, G., White, N. J. & Farrar, J. J. (2002).** Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**, 1770–82.
- Parsons, D. A. & Heffron, F. (2005).** *sciS*, an *icmF* homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* **73**, 4338–45.
- Patel, J. C. & Galán, J. E. (2006).** Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**, 453–63.
- Pavlova, B., Volf, J., Ondrackova, P., Matiasovic, J., Stepanova, H., Crhanova, M., Karasova, D., Faldyna, M. & Rychlik, I. (2011).** SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Vet Res* **42**, 16. BioMed Central Ltd.
- Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M. & Bao, S. (2008).** Krüppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1996–2001.
- Perez, J. C., Latifi, T. & Groisman, E. A. (2008).** Overcoming H-NS-mediated transcriptional silencing of horizontally acquired genes by the PhoP and SlyA proteins in *Salmonella enterica*. *J Biol Chem* **283**, 10773–83.
- Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. & Hengge, R. (2008).** Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **22**, 2434–46.

- Pezoa, D., Yang, H., Blondel, C. J., Santiviago, C. A. & Andrews, H. L. (2013).** The Type VI Secretion System Encoded in SPI-6 Plays a Role in Gastrointestinal Colonization and Systemic Spread of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the Chicken. *Infection* **8**.
- Piscatelli, H. L., Li, M. & Zhou, D. (2016).** Dual 4- and 5-phosphatase activities regulate SopB-dependent phosphoinositide dynamics to promote bacterial entry. *Cell Microbiol* **18**, 705–19.
- Popoff, M. Y., Bockemühl, J. & Gheesling, L. L. (2004).** Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol* **155**, 568–70.
- Porwollik, S., Boyd, E. F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. & McClelland, M. (2004).** Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol* **186**, 5883–98.
- Prieto, A. I., Hernández, S. B., Cota, I., Pucciarelli, M. G., Orlov, Y., Ramos-Morales, F., García-Del Portillo, F. & Casadesús, J. (2009).** Roles of the outer membrane protein *asmA* of *Salmonella enterica* in the control of *marRAB* expression and invasion of epithelial cells. *J Bacteriol* **191**, 3615–3622.
- Prunotto, M., Farina, A., Lane, L., Pernin, A., Schifferli, J., Hochstrasser, D. F., Lescuyer, P. & Moll, S. (2013).** Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *J Proteomics* **82**, 193–229.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F. & Mekalanos, J. J. (2006).** Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci* **103**, 1528–1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B. & Miyata, S. T. (2009).** The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* **12**, 11–7.
- Queiroz, M. H., Madrid, C., Paytubi, S., Balsalobre, C. & Juárez, A. (2011).** Integration host factor alleviates H-NS silencing of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium master regulator of SPI1, *hilA*. *Microbiology* **157**, 2504–14.
- Raghunathan, D., Wells, T. J., Morris, F. C., Shaw, R. K., Bobat, S., Peters, S. E., Paterson, G. K., Jensen, K. T., Leyton, D. L. & other authors. (2011).** SadA, a trimeric autotransporter from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, can promote biofilm formation and provides limited protection against infection. *Infect Immun* **79**, 4342–52.
- Rajashekar, R., Liebl, D., Seitz, A. & Hensel, M. (2008).** Dynamic remodeling of the endosomal system during formation of *Salmonella*-induced filaments by intracellular *Salmonella enterica*. *Traffic* **9**, 2100–16.
- Rajashekar, R., Liebl, D., Chikkaballi, D., Liss, V. & Hensel, M. (2014).** Live cell imaging reveals novel functions of *Salmonella enterica* SPI2-T3SS effector proteins in remodeling of the host cell endosomal system. *PLoS One* **9**, e115423.
- Ramos-Morales, F. (2012).** Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion

- System Effectors on the Eukaryotic Host Cell. *ISRN Cell Biol* **2012**, 1–36.
- Ramsden, A. E., Mota, L. J., Münter, S., Shorte, S. L. & Holden, D. W. (2007).** The SPI-2 type III secretion system restricts motility of *Salmonella*-containing vacuoles. *Cell Microbiol* **9**, 2517–29.
- Rathinavelan, T., Tang, C. & De Guzman, R. N. (2011).** Characterization of the interaction between the *Salmonella* type III secretion system tip protein SipD and the needle protein PrgI by paramagnetic relaxation enhancement. *J Biol Chem* **286**, 4922–30.
- Reed, L. J. & Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* **27**, 493–497.
- Rêgo, A. T., Chandran, V. & Waksman, G. (2010).** Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**, 475–88.
- Reid, A., Gould, A., Brand, N., Cook, M., Strutt, P., Li, J., Licht, J., Waxman, S., Krumlauf, R. & Zelent, A. (1995).** Leukemia translocation gene, *PLZF*, is expressed with a speckled nuclear pattern in early hematopoietic progenitors. *Blood* **86**, 4544–52. American Society of Hematology.
- Ren, S., Smith, M. J., Louro, I. D., McKie-Bell, P., Bani, M. R., Wagner, M., Zochodne, B., Redden, D. T., Grizzle, W. E. & other authors. (2000).** The p44S10 locus, encoding a subunit of the proteasome regulatory particle, is amplified during progression of cutaneous malignant melanoma. *Oncogene* **19**, 1419–1427.
- Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F. & Vance, R. E. (2006).** Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* **2**, e18.
- Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S. M., Mihalek, I., Williams, C. L. & Bertuch, A. A. (2013).** TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres. *Cell Rep* **5**, 194–206.
- Roberts, S. A., Strande, N., Burkhalter, M. D., Strom, C., Havener, J. M., Hasty, P. & Ramsden, D. A. (2010).** Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends. *Nature* **464**, 1214–7.
- Rogers, L. D., Kristensen, A. R., Boyle, E. C., Robinson, D. P., Ly, R. T., Finlay, B. B. & Foster, L. J. (2008).** Identification of cognate host targets and specific ubiquitylation sites on the *Salmonella* SPI-1 effector SopB/SigD. *J Proteomics* **71**, 97–108.
- Rolhion, N., Furniss, R. C. D., Grabe, G., Ryan, A., Liu, M., Matthews, S. A. & Holden, D. W. (2016).** Inhibition of Nuclear Transport of NF- κ B p65 by the *Salmonella* Type III Secretion System Effector SpvD. *PLoS Pathog* **12**, e1005653.
- Rolland, T., Taşan, M., Charlotiaux, B., Pevzner, S. J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C. & other authors. (2014).** A Proteome-Scale Map of

- the Human Interactome Network. *Cell* **159**, 1212–1226.
- Rotger, R. & Casadesús, J. (1999).** The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* **2**, 177–84.
- Ruan, H.-H., Li, Y., Zhang, X.-X., Liu, Q., Ren, H., Zhang, K.-S. & Zhao, H. (2014).** Identification of TRAF6 as a ubiquitin ligase engaged in the ubiquitination of SopB, a virulence effector protein secreted by *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* **447**, 172–7.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X.-J., Beuzón, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E. & Holden, D. W. (2002).** Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* **44**, 645–61.
- Rytkönen, A., Poh, J., Garmendia, J., Boyle, C., Thompson, A., Liu, M., Freemont, P., Hinton, J. C. D. & Holden, D. W. (2007).** SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3502–7.
- Sabbagh, S. C., Forest, C. G., Lepage, C., Leclerc, J.-M. & Daigle, F. (2010).** So similar, yet so different: uncovering distinctive features in the genomes of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 1–13.
- Saier, M. H. (2006).** Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* **214**, 75–90.
- Salcedo, S. P. & Holden, D. W. (2003).** SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network. *EMBO J* **22**, 5003–14.
- Salinas, R. E., Ogohara, C., Thomas, M. I., Shukla, K. P., Miller, S. I. & Ko, D. C. (2014).** A cellular genome-wide association study reveals human variation in microtubule stability and a role in inflammatory cell death. *Mol Biol Cell* **25**, 76–86.
- Sanderson, K. E., Hessel, A. & Rudd, K. E. (1995).** Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII. *Microbiol Rev* **59**, 241–303.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsois, R. M., Kingsley, R. A., Garry Adams, L. & Bäumler, A. J. (2001).** Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect* **3**, 1335–1344.
- Schechter, L. M. & Lee, C. A. (2001).** AraC/XylS family members, HilC and HilD, directly bind and derepress the *Salmonella typhimurium* *hilA* promoter. *Mol Microbiol* **40**, 1289–1299.
- Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S. & Postberg, J. (2011).** H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma* **120**, 275–85.
- Schlumberger, M. C. & Hardt, W.-D. (2006).** *Salmonella* type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. *Curr Opin Microbiol* **9**, 46–54.
- Schlumberger, M. C., Friebe, A., Buchwald, G., Scheffzek, K., Wittinghofer, A. &**

- Hardt, W.-D. (2003).** Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem* **278**, 27149–59.
- Schmieger, H. (1972).** Phage P22-mutants with increased or decreased transduction abilities. *Mol Gen Genet* **119**, 75–88.
- Schmitt, C. K., Ikeda, J. S., Darnell, S. C., Watson, P. R., Bispham, J., Wallis, T. S., Weinstein, D. L., Metcalf, E. S. & O'Brien, A. D. (2001).** Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis. *Infect Immun* **69**, 5619–25.
- Schraidt, O. & Marlovits, T. C. (2011).** Three-dimensional model of *Salmonella*'s needle complex at subnanometer resolution. *Science* **331**, 1192–5.
- Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galán, J. E. & Marlovits, T. C. (2010).** Topology and organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**, e1000824. Public Library of Science.
- Schroeder, N., Henry, T., de Chastellier, C., Zhao, W., Guilhon, A.-A., Gorvel, J.-P. & Méresse, S. (2010).** The virulence protein SopD2 regulates membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *PLoS Pathog* **6**, e1001002.
- Schroeder, N., Mota, L. J. & Méresse, S. (2011).** *Salmonella*-induced tubular networks. *Trends Microbiol* **19**, 268–77.
- Segura, I., Casadesús, J. & Ramos-Morales, F. (2004).** Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J Microbiol Methods* **56**, 83–91.
- Selig, L., Benichou, S., Rogel, M. E., Wu, L. I., Vodicka, M. A., Sire, J., Benarous, R. & Emerman, M. (1997).** Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J Virol* **71**, 4842–6.
- Serna, M., Carranza, G., Martín-Benito, J., Janowski, R., Canals, A., Coll, M., Zabala, J. C. & Valpuesta, J. M. (2015).** The structure of the complex between α -tubulin, TBCE and TBCB reveals a tubulin dimer dissociation mechanism. *J Cell Sci* **128**, 1824–34.
- Seth-Smith, H. M. B. (2008).** SPI-7: *Salmonella*'s Vi-Encoding Pathogenicity Island. *J Infect Dev Ctries* **2**, 267–271.
- Shapiro, S. D., Kobayashi, D. K. & Ley, T. J. (1993).** Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* **268**, 23824–9.
- Sherman, F., Fink, G. R. & Hicks, J. B. (1986).** Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Shirakawa, R., Fukai, S., Kawato, M., Higashi, T., Kondo, H., Ikeda, T., Nakayama, E., Okawa, K., Nureki, O. & other authors. (2009).** Tuberous sclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases. *J Biol Chem* **284**, 21580–8.
- Silphaduang, U., Mascarenhas, M., Karmali, M. & Coombes, B. K. (2007).** Repression of intracellular virulence factors in *Salmonella* by the Hha and YdgT nucleoid-associated proteins. *J Bacteriol* **189**, 3669–73.
- Simonet, W. ., Lacey, D. ., Dunstan, C. ., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H. ., Wooden, S., Bennett, L. & other authors. (1997).** Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* **89**, 309–319. Elsevier.
- Smith, A. C., Heo, W. Do, Braun, V., Jiang, X., Macrae, C., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., Grinstein, S., Meyer, T. & Brumell, J. H. (2007).** A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Cell Biol* **176**, 263–8.
- Sorg, J. A., Miller, N. C. & Schneewind, O. (2005).** Substrate recognition of type III secretion machines--testing the RNA signal hypothesis. *Cell Microbiol* **7**, 1217–25.
- Sory, M. P. & Cornelis, G. R. (1994).** Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol Microbiol* **14**, 583–94.
- Sory, M. P., Boland, A., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. (1995).** Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11998–2002.
- Srikanth, C. V., Wall, D. M., Maldonado-Contreras, A., Shi, H. N., Zhou, D., Demma, Z., Mumy, K. L. & McCormick, B. A. (2010).** *Salmonella* pathogenesis and processing of secreted effectors by caspase-3. *Science* **330**, 390–3.
- Steele-Mortimer, O., Knodler, L. A., Marcus, S. L., Scheid, M. P., Goh, B., Pfeifer, C. G., Duronio, V. & Finlay, B. B. (2000).** Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector *sigD*. *J Biol Chem* **275**, 37718–24.
- Steele-Mortimer, O. (2008).** The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**, 38–45.
- Stein, M. A., Leung, K. Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F. & Finlay, B. B. (1996).** Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**, 151–64.
- Stender, S., Friebe, A., Linder, S., Rohde, M., Miold, S. & Hardt, W. D. (2000).** Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**, 1206–21.
- Stewart, M. K., Cummings, L. A., Johnson, M. L., Berezow, A. B. & Cookson, B. T. (2011).** Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion

- of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20742–7.
- Sullivan, K. F., Hechenberger, M. & Masri, K. (1994).** Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol* **127**, 581–92.
- Sun, H., Kamanova, J., Lara-Tejero, M., Galán, J. E., Isaac, D., Isberg, R., Alix, E., Mukherjee, S., Roy, C. & other authors. (2016).** A Family of *Salmonella* Type III Secretion Effector Proteins Selectively Targets the NF- κ B Signaling Pathway to Preserve Host Homeostasis. *PLOS Pathog* **12**, e1005484 (D. J. Philpott, Ed.). Public Library of Science.
- Sun, Y.-H., Rolán, H. G. & Tsolis, R. M. (2007).** Injection of flagellin into the host cell cytosol by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *J Biol Chem* **282**, 33897–901.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D. & Almouzni, G. (2011).** The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* **21**, 421–34.
- Szeto, J., Namolovan, A., Osborne, S. E., Coombes, B. K. & Brumell, J. H. (2009).** *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. *Infect Immun* **77**, 996–1007.
- Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W. & Kurumizaka, H. (2011).** Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **67**, 578–583. International Union of Crystallography.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. & Nakatani, Y. (2004).** Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Cell* **116**, 51–61. Elsevier.
- Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E. & Yamamoto, T. (2005).** Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to downregulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol Microbiol* **55**, 839–52.
- Takaya, T., Kasatani, K., Noguchi, S. & Nikawa, J. (2009).** Functional Analyses of Immediate Early Gene *ETR101* Expressed in Yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 1653–1660.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. & Kokkinidis, M. (2004).** Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805–16.
- Tang, Y. T., Gao, R., Havranek, J. J., Groisman, E. A., Stock, A. M. & Marshall, G. R. (2012).** Inhibition of bacterial virulence: drug-like molecules targeting the *Salmonella enterica* PhoP response regulator. *Chem Biol Drug Des* **79**, 1007–17.
- Tattoli, I., Sorbara, M. T., Vuckovic, D., Ling, A., Soares, F., Carneiro, L. A. M., Yang, C., Emili, A., Philpott, D. J. & Girardin, S. E. (2012).** Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe* **11**, 563–75.
- Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. & Mekalanos, J. J. (1987).** Use of *phoA*

- gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2833–7.
- Teixidó, L., Carrasco, B., Alonso, J. C., Barbé, J. & Campoy, S. (2011).** Fur activates the expression of *Salmonella enterica* pathogenicity island 1 by directly interacting with the *hilD* operator *in vivo* and *in vitro*. *PLoS One* **6**, e19711.
- Terebiznik, M. R., Vieira, O. V, Marcus, S. L., Slade, A., Yip, C. M., Trimble, W. S., Meyer, T., Finlay, B. B. & Grinstein, S. (2002).** Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial *SigD* promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. *Nat Cell Biol* **4**, 766–73.
- Thirkettle, H. J., Mills, I. G., Whitaker, H. C. & Neal, D. E. (2009).** Nuclear LYRIC/AEG-1 interacts with PLZF and relieves PLZF-mediated repression. *Oncogene* **28**, 3663–70. Macmillan Publishers Limited.
- Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C. & Cowan, N. J. (1997).** Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol* **138**, 821–32.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A. D., Garrity, G. M. & Euzéby, J. P. (2005).** Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 521–4. Microbiology Society.
- Ting, N. S. Y., Yu, Y., Pohorelic, B., Lees-Miller, S. P. & Beattie, T. L. (2005).** Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res* **33**, 2090–8.
- Tischler, A. D. & McKinney, J. D. (2010).** Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol* **13**, 93–9.
- Townsend, S. M., Kramer, N. E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., Stevens, K., Maloy, S., Parkhill, J. & other authors. (2001).** *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**, 2894–901.
- Troxell, B., Sikes, M. L., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. & Hassan, H. M. (2011).** Fur negatively regulates *hns* and is required for the expression of HilA and virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **193**, 497–505.
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. & Higashio, K. (1997).** Isolation of a Novel Cytokine from Human Fibroblasts That Specifically Inhibits Osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 137–142.
- Tu, X., Nisan, I., Miller, J. F., Hanski, E. & Rosenshine, I. (2001).** Construction of mini-Tn5cyaA' and its utilization for the identification of genes encoding surface-exposed and secreted proteins in *Bordetella bronchiseptica*. *FEMS Microbiol Lett* **205**, 119–123. The Oxford University Press.
- Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N. W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L. & Chen, J. (1994).** Human DNA helicase II: a novel

- DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J* **13**, 4991–5001.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L. (2001).** Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15264–9.
- Valinsky, L., Nisan, I., Tu, X., Nisan, G., Rosenshine, I., Hanski, E., Barash, I., Manulis, S., Genetics, M. & other authors. (2002).** A host-specific virulence protein of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* is translocated into human epithelial cells by the Type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Plant Pathol* **3**, 97–101.
- Van Aelst, L. (1998).** Two-hybrid analysis of Ras-Raf interactions. *Methods Mol Biol* **84**, 201–22.
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A. & Wigler, M. (1993).** Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6213–7.
- Van der Velden, A. W. M., Velasquez, M. & Starnbach, M. N. (2003).** *Salmonella* rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* **171**, 6742–9.
- Van Immerseel, F., Eeckhaut, V., Boyen, F., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2008).** Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hila*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 455–61.
- Véscovi, E. G., Soncini, F. C. & Groisman, E. A. (1996).** Mg²⁺ as an Extracellular Signal: Environmental Regulation of *Salmonella* Virulence. *Cell* **84**, 165–174. Elsevier.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956).** Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**, 97–106.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. & Cooper, J. A. (1993).** Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* **74**, 205–214. Elsevier.
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F. & Filloux, A. (2001).** Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**, 6735–41.
- Wagner, C. & Hensel, M. (2011).** Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. *Adv Exp Med Biol* **715**, 17–34.
- Wall, D. M., Nadeau, W. J., Pazos, M. A., Shi, H. N., Galyov, E. E. & McCormick, B. A. (2007).** Identification of the *Salmonella enterica* serotype typhimurium SipA domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cell Microbiol* **9**, 2299–313.
- Walthers, D., Carroll, R. K., Navarre, W. W., Libby, S. J., Fang, F. C. & Kenney, L. J. (2007).** The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol* **65**, 477–93.
- Walthers, D., Li, Y., Liu, Y., Anand, G., Yan, J. & Kenney, L. J. (2011).** *Salmonella*

- enterica* response regulator SsrB relieves H-NS silencing by displacing H-NS bound in polymerization mode and directly activates transcription. *J Biol Chem* **286**, 1895–902.
- Wang, W., Ding, J., Allen, E., Zhu, P., Zhang, L., Vogel, H. & Yang, Y. (2005).** Gigaxonin interacts with tubulin folding cofactor B and controls its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. *Curr Biol* **15**, 2050–5. Elsevier.
- Wang, Y., Sun, M., Bao, H. & White, A. P. (2013).** T3_MM: a Markov model effectively classifies bacterial type III secretion signals. *PLoS One* **8**, e58173.
- Wasylnka, J. A., Bakowski, M. A., Szeto, J., Ohlson, M. B., Trimble, W. S., Miller, S. I. & Brumell, J. H. (2008).** Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication. *Infect Immun* **76**, 2722–35.
- Watanabe, T. K., Shimizu, F., Nagata, M., Kawai, A., Fujiwara, T., Nakamura, Y., Takahashi, E. & Hirai, Y. (1996).** Cloning, expression, and mapping of CKAPI, which encodes a putative cytoskeleton-associated protein containing a CAP-GLY domain. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 208–11.
- Wille, T., Wagner, C., Mittelstädt, W., Blank, K., Sommer, E., Malengo, G., Döhler, D., Lange, A., Sourjik, V. & other authors. (2014).** SiiA and SiiB are novel type I secretion system subunits controlling SPI4-mediated adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol* **16**, 161–178.
- Willis, D. M., Loewy, A. P., Charlton-Kachigian, N., Shao, J.-S., Ornitz, D. M. & Towler, D. A. (2002).** Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem* **277**, 37280–91.
- Winson, M. K., Swift, S., Hill, P. J., Sims, C. M., Griesmayr, G., Bycroft, B. W., Williams, P. & Stewart, G. S. (1998).** Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**, 193–202.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G. & other authors. (2010).** Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**, 426–9.
- Wishart, M. J. & Dixon, J. E. (1998).** Gathering STYX: phosphatase-like form predicts functions for unique protein-interaction domains. *Trends Biochem Sci* **23**, 301–306. Elsevier.
- De Wit, S., Taelman, H., Van de Perre, P., Rouvroy, D. & Clumeck, N. (1988).** *Salmonella* bacteremia in African patients with human immunodeficiency virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**, 45–7.
- Wong, L. H., McGhie, J. D., Sim, M., Anderson, M. A., Ahn, S., Hannan, R. D., George, A. J., Morgan, K. A., Mann, J. R. & Choo, K. H. A. (2010).** ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere

- structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res* **20**, 351–60.
- Worley, M. J., Ching, K. H. & Heffron, F. (2000).** *Salmonella* SsrB activates a global regulon of horizontally acquired genes. *Mol Microbiol* **36**, 749–61.
- Wu, H., Jones, R. M. & Neish, A. S. (2012).** The *Salmonella* effector AvrA mediates bacterial intracellular survival during infection in vivo. *Cell Microbiol* **14**, 28–39.
- Wu, S., Ye, Z., Liu, X., Zhao, Y., Xia, Y., Steiner, A., Petrof, E. O., Claud, E. C. & Sun, J. (2010).** *Salmonella typhimurium* infection increases p53 acetylation in intestinal epithelial cells. *AJP Gastrointest Liver Physiol* **298**, G784–G794.
- Xie, H. X., Yu, H. B., Zheng, J., Nie, P., Foster, L. J., Mok, Y.-K., Finlay, B. B. & Leung, K. Y. (2010).** EseG, an Effector of the Type III Secretion System of *Edwardsiella tarda*, Triggers Microtubule Destabilization. *Infect Immun* **78**, 5011–5021.
- Xu, W.-P., Shiba, H., Mizuno, N., Uchida, Y., Mouri, Y., Kawaguchi, H. & Kurihara, H. (2004).** Effect of bone morphogenetic proteins-4, -5 and -6 on DNA synthesis and expression of bone-related proteins in cultured human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int* **28**, 675–82.
- Yang, Z., Soderholm, A., Lung, T. W. F., Giogha, C., Hill, M. M., Brown, N. F., Hartland, E. & Teasdale, R. D. (2015).** SseK3 Is a *Salmonella* Effector That Binds TRIM32 and Modulates the Host's NF- κ B Signalling Activity. *PLoS One* **10**, e0138529.
- Ye, Z., Petrof, E. O., Boone, D., Claud, E. C. & Sun, J. (2007).** *Salmonella* effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am J Pathol* **171**, 882–92.
- Yoon, H., Lim, S., Heu, S., Choi, S. & Ryu, S. (2003).** Proteome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *fis* mutant. *FEMS Microbiol Lett* **226**, 391–6.
- Yoshida, M., Yoshida, K., Kozlov, G., Lim, N. S., De Crescenzo, G., Pang, Z., Berlanga, J. J., Kahvejian, A., Gehring, K. & other authors. (2006).** Poly(A) binding protein (PABP) homeostasis is mediated by the stability of its inhibitor, Paip2. *EMBO J* **25**, 1934–44.
- Yu, X.-J., Liu, M. & Holden, D. W. (2004).** SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol* **54**, 604–19.
- Yu, X.-J., McGourty, K., Liu, M., Unsworth, K. E. & Holden, D. W. (2010).** pH sensing by intracellular *Salmonella* induces effector translocation. *Science* **328**, 1040–3.
- Zhang, S., Lillehoj, H. S., Kim, C. H., Keeler, C. L., Babu, U. & Zhang, M. Z. (2008).** Transcriptional response of chicken macrophages to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. *Dev Biol (Basel)* **132**, 141–51.
- Zhang, T., Dong, K., Liang, W., Xu, D., Xia, H., Geng, J., Najafzadeh, A., Liu, M., Li, Y. & other authors. (2015a).** G-protein-coupled receptors regulate autophagy by ZBTB16-mediated ubiquitination and

- proteasomal degradation of Atg14L. *Elife* **4**, e06734.
- Zhang, X., Abreu, J. G., Yokota, C., MacDonald, B. T., Singh, S., Coburn, K. L. A., Cheong, S.-M., Zhang, M. M., Ye, Q.-Z. & other authors. (2012).** Tiki1 is required for head formation via Wnt cleavage-oxidation and inactivation. *Cell* **149**, 1565–77.
- Zhang, Y., Higashide, W. M., McCormick, B. a., Chen, J. & Zhou, D. (2006).** The inflammation-associated *Salmonella* SopA is a HECT-like E3 ubiquitin ligase. *Mol Microbiol* **62**, 786–93.
- Zhang, Y., Wu, S., Ma, J., Xia, Y., Ai, X. & Sun, J. (2015b).** Bacterial protein AvrA stabilizes intestinal epithelial tight junctions via blockage of the C-Jun N-terminal kinase pathway. *Tissue barriers* **3**, e972849.
- Zhou, D., Mooseker, M. S. & Galán, J. E. (1999).** An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10176–81.
- Zhou, H. & Clapham, D. E. (2009).** Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 15750–5.
- Zuberi, K., Franz, M., Rodriguez, H., Montojo, J., Lopes, C. T., Bader, G. D. & Morris, Q. (2013).** GeneMANIA prediction server 2013 update. *Nucleic Acids Res* **41**, W115–22

